

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Exatas  
Departamento de Química

Mariana Cristina da Silva

OTIMIZAÇÃO, COMPARAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO  
E QUANTIFICAÇÃO DE PESTICIDAS E HPAs EM CACHAÇA

Belo Horizonte

2017

UFMG/ICEX/DQ. 1231<sup>a</sup>  
D. 676<sup>a</sup>

Mariana Cristina da Silva

OTIMIZAÇÃO, COMPARAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO  
E QUANTIFICAÇÃO DE PESTICIDAS E HPAs EM CACHAÇA

Dissertação apresentada ao Departamento de  
Química do Instituto de Ciências Exatas da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Química – Química Analítica

Orientadora: Adriana Ferreira Faria  
Coorientador: Rodinei Augusti  
Colaborador: Mauro Lúcio Gonçalves de Oliveira

Belo Horizonte

2017

S586o Silva, Mariana Cristina da  
2017 Otimização, comparação e validação de métodos de  
D extração e quantificação de pesticidas e HPAs em  
cachaça [manuscrito] / Mariana Cristina da Silva.  
2017.

101 f. : il.

Orientadora: Adriana Ferreira Faria.

Coorientador: Rodinei Augusti.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Minas Gerais - Departamento de Química.

Inclui bibliografia.


1. Química Analítica - Teses 2. Cachaça - Teses 3.  
Pesticidas - Teses 4. Hidrocarbonetos policíclicos  
aromáticos - Teses 5. Extração por solventes - Teses  
6. Cromatografia de gás - Aplicações industriais -  
Teses 7. Validação de método - Teses I. Faria, Adriana  
Ferreira, Orientadora II. Augusti, Rodinei,  
Coorientador III. Título.

CDU 043

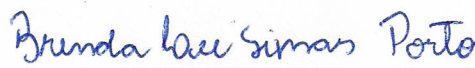
**"Otimização, Comparação e Validação de Métodos de Extração e Quantificação de Pesticidas e HPAs em Cachaça"**

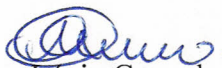
**Mariana Cristina da Silva**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Prof. Adriana Ferreira Faria - Orientadora  
UFMG

  
Prof. Marcus Henrique Canuto  
UFVJM

  
Prof. Brenda Lee Simas Porto  
UFMG

  
Prof. Mauro Lúcio Gonçalves de Oliveira  
LANAGRO - MG

Belo Horizonte, 27 de julho de 2017.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, base de todas minhas decisões, força que conduz minha vida;

Aos meus pais, que amo incondicionalmente, e que sempre me apoiam em todos os momentos, fazendo mais do que podem para me ajudar a realizar meus objetivos;

Às minhas amigas, Cíntia e Marina, presentes que Deus me deu, pelo incentivo, carinho e motivação;

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Ferreira Faria, não só por esses dois anos de mestrado, mas por todos os anos de trabalho em conjunto que temos, pela compreensão, dedicação, motivação e apoio, em todos os momentos;

Ao meu coorientador Prof. Dr. Rodinei Augusti, por me amparar no momento que mais precisei;

Aos amigos do LANAGRO/MG, principalmente, aos do laboratório de pesticidas, Raquel, Nilsrael, Eduardo, Gustavo, José Ailton, Gilsara, pelo acolhimento no laboratório e ao Mauro, por todos os ensinamentos, pela paciência e dedicação;

Ao Nilson César Castanheira, chefe da divisão técnica laboratorial, por ter permitido a realização do trabalho nas dependências do LANAGRO/MG;

Ao amigo Thiago Borgati, por todos os conselhos;

Aos amigos da “carona”, Amanda e Guilherme, que compensavam o cansaço da viagem com suas companhias agradáveis;

Aos amigos do laboratório 214, que são “tops” em todos os sentidos;

Aos produtores de cachaça que, gentilmente, cederam amostras para a realização do trabalho;

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Química;

Ao programa de pós-graduação;

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

## RESUMO

Este trabalho detalha o desenvolvimento e a validação de dois métodos multirresíduos: um para determinação de 95 pesticidas e outro para 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), ambos em cachaça, empregando um único procedimento de extração líquido-líquido com adição de sais. Os analitos foram separados, identificados e quantificados empregando a GC-MS/MS, no modo de monitoramento de reações selecionadas. Três procedimentos de extração e *clean-up* foram otimizados, através de planejamentos fatoriais, e comparados quanto à recuperação e repetibilidade: extração líquido-líquido, extração em fase sólida e extração líquido-líquido com adição de sais. Na extração líquido-líquido, a condição otimizada consistiu na evaporação de 40% do volume da amostra e no uso de diclorometano como solvente extrator. Na extração em fase sólida, a condição adotada foi: evaporação de 40% do volume da amostra, limpeza do cartucho com 5 mL de água ultrapura e eluição dos analitos com 10 mL de diclorometano. Na extração líquido-líquido com adição de sais foi otimizada a extração com 10 mL de diclorometano. O último procedimento foi avaliado como o mais adequado para a extração e *clean-up* dos analitos em estudo e, validado seguindo os critérios preconizados por órgãos fiscalizadores. Os parâmetros de validação avaliados mostraram bom desempenho dos métodos, ambos com linearidades adequadas,  $t_r$  calculado maior que o valor crítico, ao nível de 95% de confiança. Pesticidas: recuperações entre 81-113%, coeficiente de variação  $\leq 20\%$ , para pelo menos dois níveis de fortificação, exceto para lambda cialotrina e metamidofós; limites de detecção e quantificação, 0,0025 e 0,01 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. HPAs: recuperações entre 84,76-120,78%, coeficiente de variação entre 6,23-27,33%; limites de detecção e quantificação, 0,00025 e 0,001 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. A incerteza de medição foi verificada e apresentou bons resultados, principalmente nos níveis de maior relevância analítica. Foram analisadas 26 amostras entre: amostras comerciais de cachaça e frações de destilação de dois alambiques. Os resultados mostraram contaminação por 31 pesticidas e 12 diferentes HPAs, sendo fenbuconazol (presente em 10 amostras) e o benzo(a)pireno (presente em 19 amostras), os representantes mais incidente de cada classe de contaminantes.

Palavra-chave: Cachaça; Pesticidas; Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; Extração líquido-líquido com adição de sais; GC-MS/MS; Validação.

## ABSTRACT

This work aims at analyzing the development and validation of two multiresidue methods: one to determine 95 pesticides and another to determine 16 polycyclic aromatic hydrocarbons, both in “cachaça”, using a sole liquid-liquid extraction procedure with the addition of salts. The analytes were separated, identified and quantified by means of GC-MS/MS, in select reaction monitoring mode. Three extractions and clean-up procedures were optimized and compared as to recovery and repeatability: liquid-liquid extraction, solid phase extraction and liquid-liquid extraction with salt addition. The liquid-liquid extraction, at optimized condition, consisted of evaporation of 40% of the sample volume and the use of dichloromethane as solvent extractor. The solid phase extraction, at optimized condition, consisted of: evaporation of 40% of sample volume, cleaning of the cartridge with 5 mL of ultrapure water and elution of the analytes with 10 mL of dichloromethane. The liquid-liquid extraction with salt addition was optimized with 10 mL of dichloromethane. The last procedure was evaluated as the most adequate for extraction and clean-up of the analytes studied and validated according to criteria recommended by monitoring agencies. The validation parameters evaluated showed good performance of both methods, with adequate linearities, and  $t_r$  calculated was greater than the critical value, at confidence level of 95%. Pesticides: trueness with recoveries between 81–113%; variation coefficient  $\leq$  20%, for at least two fortification levels, except for lambda cyhalothrin and methamidophos; detection and quantification limits, 0.0025 and 0.01 mg L<sup>-1</sup>, respectively. PAHs: trueness with recoveries between 84.76–120.78%; variation coefficient between 6.23–27.33%; detection and quantification limits, 0.00025 and 0.001 mg L<sup>-1</sup>, respectively. Measurement uncertainty was verified and presented good results, mainly at higher relevant analytical levels. Twenty-six samples were analyzed: commercial “cachaça” samples and “head”, “heart” and “tail” to distillation fractions of two stilleries. The results showed contamination by 31 pesticides and 12 different PAHs, with fenbuconazole (present in 10 samples) and benzo(a)pyrene (present in 19 samples), the most present representative of each category of contaminants.

**Keywords:** “Cachaça”; Pesticides; Polycyclic Aromatic Hydrocarbon; Liquid-liquid extraction with salt addition; GC-MS/MS; Validation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estruturas moleculares dos 16 HPAs, que integram a listas dos 15 + 1 HPAs de prioridade de monitoramento da EU. ....	25
Figura 3.1: Esquema das combinações de extrações realizadas para o planejamento $2^2$ . ....	42
Figura 3.2: Representação do planejamento fatorial Box-Behnken $3^3$ . ....	43
Figura 4.1: Cromatograma dos íons extraídos do método multirresíduos para análise de pesticidas em cachaça. ....	53
Figura 4.2: Cromatograma da análise de HPAs, no modo SRM, que mostra a separação dos isômeros BbFA, BkFA e BjFA. ....	54
Figura 4.3: Cromatograma dos íons extraídos do método de análise de HPAs em cachaça. ....	55
Figura 4.4: Gráfico de Pareto dos efeitos estimados no planejamento fatorial $2^2$ realizado na otimização da extração líquido-líquido ....	56
Figura 4.5: Curva de nível obtida no planejamento $2^2$ empregado na otimização da extração líquido-líquido. Eixo A: fator evaporação e eixo B: fator solvente. ....	57
Figura 4.6: Gráfico de Pareto dos efeitos estimados no planejamento fatorial Box-Behnken $3^3$ realizado na otimização da extração em fase sólida. A: evaporação inicial linear; B: limpeza; C: vol. de solvente; 1: linear; 2: quadrático. ....	58
Figura 4.7: Gráfico de Pareto dos efeitos estimados no planejamento fatorial $2^2$ , realizado na otimização da extração líquido-líquido com adição de sais. ....	59
Figura 4.8: Curva de nível obtida para o planejamento $2^2$ na otimização da extração líquido-líquido com adição de sais. Eixo A: fator volume de solvente de extração e eixo B: fator tipo de solvente. ....	60
Figura 4.9: Razão de área, em porcentagem, das extrações utilizando 20 mL de solvente pelas extrações utilizando 10 mL de solvente, para os dois solventes. ....	61

Figura 4.10: Razão de área, em porcentagem, das extrações utilizando diclorometano pelas extrações utilizando acetonitrila, nos dois volumes de solventes. .... 61

Figura 4.11: Número de analitos, em cada nível de fortificação, que satisfizeram os critérios de recuperação entre 70 -120% e coeficiente de variação menor que 20%. Total de analitos avaliados: 108. Procedimento A: extração líquido-líquido; procedimento B: extração em fase sólida; procedimento C: extração líquido-líquido com adição de sais. .... 63

Figura 4.12: Número de amostras em que foi observada a presença de cada pesticida. 89

Figura 4.13: Número de amostras em que foi observada a presença de cada HPA. .... 90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Limites dos teores dos componentes do coeficiente de congêneres na cachaça. ....	16
Tabela 1.2: Limite máximo do teor específico de contaminantes orgânico ou inorgânico na cachaça.....	16
Tabela 1.3: Classificação de toxicológica, segundo DL <sub>50</sub> e cor, da faixa no rótulo, específica para cada classe. ....	21
Tabela 1.4: Resumo dos métodos descritos na literatura para análise de pesticidas e HPAs em bebidas alcoólicas destiladas. ....	31
Tabela 3.1: Equipamentos e materiais utilizados no desenvolvimento e validação dos métodos. ....	35
Tabela 3.2: Relação de amostras comerciais e frações de destilação da cachaça analisadas pelos métodos desenvolvidos.....	36
Tabela 3.3: Condições cromatográficas otimizadas para o método de análise de pesticidas e método de análise de HPAs. ....	39
Tabela 3.4: Planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> para avaliação e otimização da extração líquido-líquido. ....	42
Tabela 3.5: Planejamento fatorial Box-Behnken 3 <sup>3</sup> para avaliação e otimização da SPE. ....	43
Tabela 3.6: Planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> realizado na otimização da extração pelo método de extração líquido-líquido com adição de sais. ....	43
Tabela 4.1: Critérios para definição das transições de quantificação e confirmação. ....	49
Tabela 4.2: Lista de pesticidas e HPAs analisados, com seus respectivos tempo de retenção, transição de quantificação, transição de confirmação e energia de colisão para cada transição. ....	49

Tabela 4.3: Valores dos efeitos estimados obtidos no planejamento fatorial $2^2$ realizado na otimização da extração líquido-líquido. ....	56
Tabela 4.4: Valores dos efeitos estimados obtidos no planejamento fatorial $2^2$ realizado na otimização da extração líquido-líquido com adição de sais. ....	60
Tabela 4.5: Valores de R e CV dos HPAs, obtidos no ensaio para expansão do procedimento de extração líquido-líquido com adição de sais para HPAs. As amostras foram fortificadas com $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ de cada HPA. ....	64
Tabela 4.6: Valores de $R^2$ , $t_{\text{calculado}}$ para o coeficiente de correlação, $F_{\text{faj}}$ e $F_{\text{sig}}$ , para os três dias de validação. ....	67
Tabela 4.7: Valores de R média, considerando os três dias de validação e, valores de CV para precisão intermediária, para os pesticidas. ....	75
Tabela 4.8: Valores de R média, considerando os três dias de validação e, valores de CV para precisão intermediária, para os HPAs. ....	77
Tabela 4.9: Valores de $u_{\text{comb}}$ , para os pesticidas, os níveis de concentração avaliados. ....	78
Tabela 4.10: Valores de $u_{\text{comb}}$ , para os HPAs, os níveis de concentração avaliados. ....	81
Tabela 4.11: Valor do parâmetro $\alpha$ de acordo com a concentração em estudo. ....	82
Tabela 4.12: Valores de $U_{\text{max}}$ , para pesticidas e HPAs, de acordo com o nível de concentração em avaliação. ....	82
Tabela 4.13: Teores dos pesticidas e HPAs encontrados nas amostras e frações de "cabeça", "coração" e "cauda" de destilação, analisadas utilizando os métodos validados. ....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – análise da variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BaA – benzo(a)antraceno

BaP – benzo(a)pireno

BbFA – benzo(b)fluoranteno

BcFL – benzo(c)fluoreno

BghiP – benzo(g,h,i)perileno

BjFA – benzo(j)fluoranteno

BkFA – benzo(k)fluoranteno

C<sub>18</sub> – octadecil silano

CE – Comunidade Europeia

CHR – criseno

CPP – ciclopenta(c,d)pireno

CV – coeficiente de variação

DBaeP – dibenzo(a,e)pireno

DBahA – dibenzo(a,h)antraceno

DBahP – dibenzo(a,h)pireno

DBaiP – dibenzo(a,i)pireno

DBalP – dibenzo(a,l)pireno

DCE – captura de elétrons

DDT – dicloro-difenil-tricloroetano

DI-CF-SPME – microextração em fase sólida utilizando fibra resfriada e imersão direta

DL<sub>50</sub> – limite de dosagem letal de 50%

EU – União Europeia

FDA – *Food Drug Administration*

$F_{faj} - F_{calculado}$  estimados para falta de ajuste

$F_{sig} - F_{calculado}$  estimados para significância da regressão

FMIPs – polímero fluorescente de impressão molecular

GC – cromatografia gasosa

HPAs – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

IP – indeno (1,2,3-c,d)pireno

LD – limite de detecção

LLE – extração líquido-líquido

LMR – limites máximos de resíduos

LQ – limite de quantificação

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MCH – 5-metilcriseno

MS – espectrometria de massas

NPD – nitrogênio-fósforo N-40

PAH4 – soma de benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno e criseno

PN-GSE – extração gás-sólido por nebulização pneumática

PN-GSME – microextração gás-sólido por nebulização pneumática

PTFE – politetrafluoroetileno

QuEChERS – Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe

R – recuperação

$R^2$  – coeficiente de determinação

SINDIVEG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal

SPE – extração em fase sólida

$U_{max}$  – incerteza máxima

UV-vis – ultravioleta/vis

$u_{calib}$  – incerteza de calibração

$u_{comb}$  – incerteza combinada

$u_{PI}$  – precisão intermediária

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Cachaça: contexto histórico, legislação e mercado econômico.....	14
1.2. Pesticidas: contexto histórico, classificações, legislação e cenário atual de consumo ....	18
1.3. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos: definição, origem, legislação e estudos da contaminação de bebidas .....	23
1.4. Métodos empregados na análise de pesticidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em bebidas .....	28
2. OBJETIVO .....	34
2.1. Objetivo geral.....	34
2.2. Objetivo específico .....	34
3. PARTE EXPERIMENTAL .....	35
3.1. Equipamentos e materiais .....	35
3.2. Padrões, solventes, sais, cartuchos e amostras .....	35
3.3. Preparo das soluções.....	37
3.4. Condições espectrométricas.....	38
3.5. Condições cromatográficas.....	38
3.6. Procedimento otimizado de extração líquido-líquido.....	40
3.7. Procedimento otimizado da extração em fase sólida .....	40
3.8. Procedimento otimizado de extração líquido-líquido com adição de sais .....	41
3.9. Otimização da extração líquido-líquido.....	42
3.10. Otimização da extração em fase sólida .....	42
3.11. Otimização da extração líquido-líquido com adição de sais .....	43
3.12. Comparação dos procedimentos de extração otimizados .....	44
3.13. Expansão do procedimento de extração líquido-líquido com adição de sais para determinação dos HPAs .....	44
3.14. Validação dos métodos empregando extração líquido-líquido com adição de sais .....	44
3.14.1. Linearidade.....	45
3.14.2. Veracidade e precisão.....	45
3.14.3. Limites de detecção e quantificação dos métodos .....	46
3.14.4. Incerteza de medição .....	46
3.15. Análise de amostras comerciais de cachaça e frações de “cabeça”, “coração” e “cauda” de destilação.....	47

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
4.1. Condições espectrométricas.....	49
4.2. Condições cromatográficas.....	53
4.3. Otimização da extração líquido-líquido.....	55
4.4. Otimização da extração em fase sólida .....	57
4.5. Otimização da extração líquido-líquido com adição de sais .....	59
4.6. Comparação dos procedimentos de extração otimizados .....	62
4.7. Expansão do procedimento de extração líquido-líquido com adição de sais para determinação dos HPAs .....	63
4.8. Validação dos métodos empregando extração líquido-líquido com adição de sais .....	64
4.8.1. Linearidade .....	65
4.8.2. Veracidade e precisão .....	74
4.8.3. Limites de detecção e quantificação dos métodos .....	78
4.8.4. Incerteza de medição .....	78
4.9. Análise de amostras comerciais de cachaça e frações de “cabeça”, “coração” e “cauda” de destilação.....	83
5. CONCLUSÃO.....	91
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

## 1. INTRODUÇÃO

### *1.1. Cachaça: contexto histórico, legislação e mercado econômico*

A cachaça não tem uma história consolidada de sua origem, existem duas versões mais populares. Uma diz que, a bebida foi descoberta de forma acidental em um engenho de cana em Pernambuco. O líquido formado na etapa de fervura do caldo da cana, foi armazenado por um escravo e com o passar do tempo, ocorreu a fermentação natural. Devido à mudança de temperatura, o líquido fermentado evaporou e condensou, formando pingos no teto do engenho, que seria a cachaça. Por esse motivo, a bebida também é conhecida como “pinga”. Na outra versão, o historiador Luís da Câmara Cascudo relata que, a cachaça foi produzida pelos portugueses, após aprenderem o processo de destilação com os árabes, por volta de 1532 na capitania de São Vicente (MAPA DA CACHAÇA, 2017).

Aos poucos a cachaça, bebida produzida na colônia, foi cativando novos paladares e reduzindo o mercado da bagaceira, bebida produzida na metrópole, advinda da fermentação do bagaço de uva (BRAGA, M. V. F., 2015). Por se tornar uma ameaça aos lucros da metrópole com a venda da bagaceira, várias ações foram tomadas para impedir sua ascensão. Impostos abusivos sob a fabricação e consumo foram implantados e, em algum momento, a produção foi proibida. Durante sua história, a bebida passou por outras diversas barreiras, caminhando junto com a história e lutas do país, por esse motivo, foi considerada “símbolo de resistência à dominação colonial” (ANDRADE, L. P., 2015; FEITOSA, P. C. L., 2005).

Nos últimos anos, diversos programas, organizações e legislações foram criados para promover e valorizar o mercado da cachaça. A Associação Mineira de Produtores de Cachaça de Qualidade, fundada em 1988, foi a precursora no campo de produção de cachaça, agindo também no desenvolvimento de novas técnicas para refinamento da qualidade do produto (FARIA, R. G. B., 2002). Através da Lei Estadual nº 10.853, de 4 de agosto de 1992, regulamentada pelo Decreto nº 34.645, de 14 de abril de 1993, o Programa Mineiro de Incentivo à Produção de Aguardente - Pró-Cachaça foi criado, firmando um compromisso do governo do estado de Minas Gerais com o setor (BRASIL, 1993). Posteriormente, em âmbito nacional, foi criado o Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997, regulamentou a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, com a

função de padronizar, classificar e determinar o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas (BRASIL, 1997). O Decreto nº 4.062, de 21 de dezembro de 2001, foi criado para definir as expressões “cachaça”, “Brasil” e “cachaça do Brasil” (BRASIL, 2001).

Em 2005, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005, fixa “normas relativas aos requisitos e procedimentos para registro de estabelecimentos produtores de aguardente de cana e de cachaça, organizados em sociedade cooperativa e os respectivos produtos elaborados”. O objetivo dessa Instrução Normativa foi estabelecer um padrão de qualidade e impulsionar o mercado da cachaça. A Instrução Normativa nº 13 foi alterada pela Instrução Normativa nº 58, de 19 de dezembro de 2007, e posteriormente, pela Instrução Normativa nº 27, de 15 de maio de 2008 (BRASIL, 2005). A legislação faz a definição e diferenciação entre aguardente de cana, destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar e cachaça. Segundo a Instrução Normativa nº 27, que está em vigor:

“Cachaça é denominação típica e exclusiva da Aguardente de Cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 % vol. (trinta e oito por cento em volume) a 48% vol. (quarenta e oito por cento em volume) a 20°C (vinte graus Celsius), obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6g L<sup>-1</sup> (seis gramas por litro), expressos em sacarose.”

A composição química e requisitos de qualidade também foram determinados. Limites específicos para os congêneres, compostos originados no processo de produção da cachaça (Tabela 1.1) e para os contaminantes orgânicos e inorgânicos (Tabela 1.2) foram estabelecidos (BRASIL, 2005).

Tabela 1.1: Limites dos teores dos componentes do coeficiente de congêneres na cachaça.

Componente	Limites	
	Mínimo (mg 100 mL <sup>-1</sup> )	Máximo (mg 100 mL <sup>-1</sup> )
Acidez volátil, em ácido acético	n.a. <sup>I</sup>	150
Ésteres, em acetato de etila	n.a.	200
Aldeídos, em aldeído acético	n.a.	30
Furfural + Hidroximetilfurfural	n.a.	5
Álcoois superiores <sup>II</sup>	n.a.	360
Coeficiente de congêneres <sup>III</sup>	200	650

I: não apresenta; II: soma dos alcoóis isobutílico (2-metil-propanol), isoamílicos (2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol) e n-propílico (1-propanol); III: soma da acidez volátil, ésteres, aldeídos, furfural + hidroximetilfurfural e alcoóis superiores.

Tabela 1.2: Limite máximo do teor específico de contaminantes orgânico ou inorgânico na cachaça.

Contaminante	Limite máximo
Álcool metílico	20 <sup>I</sup>
Carbamato de etila	210 <sup>II</sup>
Acroleína (2-propenal)	5 <sup>I</sup>
Álcool sec-butílico (2-butanol)	10 <sup>I</sup>
Álcool n-butílico (1-butanol)	3 <sup>I</sup>
Cobre	5000 <sup>II</sup>
Chumbo	200 <sup>II</sup>
Arsênio	100 <sup>II</sup>

I: unidade em mg 100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro; II: µg L<sup>-1</sup> da bebida.

No caso da cachaça artesanal, produzida em alambiques, para que a composição e limites estabelecidos sejam alcançados, deve-se haver a separação de três frações, rotuladas de “cabeça”, “coração” e “cauda”, separadas através do grau alcoólico. A cabeça representa 5% do conteúdo destilado, tem ponto de ebulição inferior ao do etanol e deve ser descartada, devido à presença de compostos como metanol, aldeídos e ésteres, prejudiciais a saúde do consumidor. O coração é a cachaça propriamente dita, representa 80% do conteúdo. A cauda é formada de compostos fenólicos e ácidos orgânicos, representa 15% do destilado, e também é prejudicial à saúde do consumidor (ESPINOZA, L. J. S., 2006). A produtividade da cachaça artesanal é de 60 a 80 litros

por tonelada de cana moída. A cachaça industrial, produzida em coluna de destilação contínua, rende cerca 120 a 150 litros por tonelada (ANDRADE, L. A. B., 2006).

Atualmente, a cachaça é a quarta bebida destilada de maior produção mundial, próximo de 1,7 bilhões de litros produzidos por ano. Para a safra de 2015/2016, estima-se que a produção da cana-de-açúcar, matéria-prima da cachaça, em termos de área plantada, chegou a aproximadamente 9000 mil hectares. Deste total, cerca de 2,5% é destinado a produção da cachaça. Quase a totalidade da produção é destinada ao consumo interno. Porém, a expansão do mercado internacional já é uma realidade (ALCARDE, A. R., 2014; BRASIL, 2015).

Em 2012, os governos do Brasil e dos Estados Unidos firmaram um acordo bilateral, no qual o Brasil reconhece o ‘bourbon whisky’ e o ‘tennessee whisky’ como bebidas produzidas apenas nos Estados Unidos e, a cachaça torna-se reconhecida como produto exclusivamente brasileiro no país norte-americano e não mais classificada ‘rum brasileiro’, denominação que atravancava a promoção da bebida como bebida típica do Brasil. O reconhecimento norte-americano da bebida como produto exclusivamente de produção brasileira, é um importante passo para ampliação do mercado externo mundial (PORTAL BRASIL, 2013). Em 2016, a exportação de cachaça gerou uma receita de US\$ 13,94 milhões, cerca de 8,38 milhões de litros. O produto foi exportado para mais de 54 países. Em termos de valores, a Alemanha é o principal comprador, responsável por 17,64%, seguida por Estados Unidos (16,16%) e Paraguai (11,60%). Em termos de volume de cachaça, a Alemanha continua sendo o principal destino (26,82%), porém as posições de Paraguai (20,51%) e Estados Unidos (10,12%) se invertem (IBRAC, 2017).

A relevância do setor é evidente. Calcula-se um número superior a 40 mil produtores e 5 mil diferentes marcas de aguardente, em todo o país. A receita alcança valores em torno de US\$ 600 milhões ao ano, com geração de 600 mil empregos, considerando toda estrutura que a produção engloba. Produzida em todo território nacional, o estado de São Paulo ocupa o primeiro lugar, com 44% da produção, sendo a cachaça industrial predominante. Minas Gerais é o quarto estado de maior produção da bebida, responsável por 8%, juntamente com Rio de Janeiro (8%) e Paraíba (8%). Porém, o estado mineiro é o primeiro em produção de cachaça artesanal, responsável por 50%, dos 500 milhões de litros de cachaça artesanal produzida no país (ALCARDE, A. R., 2014).

Depois de passar por diversas barreiras, de ser considerada uma bebida de qualidade inferior, hoje a cachaça vive uma época de valorização e o crescimento do mercado consumidor. O cenário atual estimula a promoção de investimentos, controle mais rigoroso e pesquisa para refinamento do processo de produção, elevando cada vez mais a qualidade química e o sabor da bebida (BRAGA, M. V. F., 2015).

### *1.2. Pesticidas: contexto histórico, classificações, legislação e cenário atual de consumo*

O emprego de substâncias, que tenham ação contra fungos, insetos e outras pragas que invadem e afetam as plantações, é conhecido desde o início da história da agricultura. Os primeiros compostos eficientes no combate a esses invasores foram descobertos de forma empírica (SANTOS, S. P., 2002). Com o desenvolvimento agrícola, bem como a mudança nas práticas de cultivo, a ampliação do uso de fertilizantes e maquinário durante a etapa de plantio, colheita e processamento da cultura, houve o aumento da incidência de pragas nas plantações. A necessidade de controlar a presença dessas pragas e reduzir as perdas nas plantações fez surgir uma grande quantidade de estudos em busca de novas substâncias, que fossem mais efetivas para as diferentes pragas existentes (BRAIBANTE, M. E. F., 2012). Os primeiros compostos tiveram origem inorgânica e vegetal. Posteriormente, compostos orgânicos de origem vegetal também tiveram o poder de combate contra essas pragas descoberto, podendo citar como exemplos, a nicotina e a rotenona (SANTOS, V. M. R., 2007).

No fim do século dezenove e começo do século vinte iniciou-se o desenvolvimento de estudos para síntese de compostos que apresentassem atividades praguicidas, os chamados pesticidas organossintéticos (SOUZA, L. C., 2017). Durante a Segunda Guerra Mundial, devido a necessidade de proteger os exércitos de doenças transmitidas por pragas e aumentar a produção agrícola devido ao aumento populacional, vários pesticidas foram desenvolvidos, alguns utilizados até hoje. Nesta época, o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), principal representante da classe dos organoclorados, teve suas propriedades inseticidas descobertas. Os compostos dessa classe apresentam grande tempo de permanência no ambiente. Essa propriedade que os torna mais eficientes, pois significa um maior tempo de atividade, também os torna uma ameaça

ambiental e para o ser humano. Com a elucidação dos mecanismos de ação desses compostos e constatação de seus efeitos tóxicos, progressivamente houve a substituição por pesticidas das novas classes, organofosforados e carbamatos. Essas novas classes também apresentam grande poder toxicológico e representam elevado risco à saúde, porém possuem um menor tempo de permanência no ambiente, sendo até hoje os mais utilizados (TOMITA, R. Y., 2002).

Os pesticidas são classificados de acordo com seu ponto de aplicação, sua origem e estrutura química. Quanto ao ponto de aplicação, os pesticidas podem ser classificados como acaricidas, no combate a ácaros; bactericidas, no combate a bactérias; nematicidas, no combate a nematoides; raticidas, no combate a roedores; formicidas, no combate a formigas; moluscicidas, no combate a moluscos; algicida, no combate a algas; além dos três tipos mais amplamente utilizados: herbicidas, inseticidas e fungicidas. Os fungicidas são utilizados para controlar a presença de fungos em plantações, sendo muito comum na agricultura convencional o uso de compostos sintéticos e bastante tóxicos, prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente. Os inseticidas são utilizados para controlar a população de insetos. Seu emprego se expande desde o uso doméstico até industrial. Os herbicidas trabalham no controle de ervas daninhas que se multiplicam entre as plantações e competem com a cultura cultivada por luz, nutrientes e água, reduzindo a produtividade e qualidade do produto, além de servirem como meio de reprodução de pragas e outras doenças (NOBREGA, H. F., 2014).

Os pesticidas podem ser designados como orgânicos ou inorgânicos, de acordo com o composto de origem. Os pesticidas de origem inorgânica ou organometálica, em geral, têm sua composição baseada em arsênio, tálio, bário, nitrogênio, fósforo, cádmio, ferro, selênio, chumbo, cobre, mercúrio e zinco. Esses compostos apresentam alta toxicidade e necessitam de grandes quantidades para serem eficazes. Os pesticidas orgânicos são subdivididos entre os de origem vegetal, constituídos principalmente de nicotina, piretrina, sabatina e rotenona, e os de origem organossintética, que compreendem os clorados, clorofosforados, fosforados e carbamatos (VILARINHO, F., 2011).

A classificação segundo a estrutura química divide os pesticidas em organoclorados, fosforados, carbamatos, triazinas, piretroides e cloroacetamidas. Os organoclorados são hidrocarbonetos clorados que apresentam um ou mais anéis aromáticos ou cíclicos

saturados na estrutura. Na classe dos organossintéticos, são os menos tóxicos, porém devido ao longo tempo de permanência no corpo e no meio-ambiente, a longo prazo, pode provocar efeitos adversos, como problemas no sistema nervoso. Um exemplo famoso desta classe é o DDT (NOBREGA, H. F., 2014; SAVOY, V. L. T., 2011).

Os organofosforados, empregados como acaricida, fungicida, inseticida e nematicida, são ésteres de ácido fosfórico, tiolofosfórico, ditiofosfórico, fosfônico, tionofosfônico. Apesar dos organofosforados terem a mais rápida degradação e não serem bioacumulados, estes são considerados os mais tóxicos entre os organossintéticos, provocando em mamíferos lacrimejo, salivação, sudorese, diarreia, tremores e distúrbios cardiorrespiratórios, além de danos ao sistema nervoso. Também representam um risco à saúde de quem aplica ou entra em contato direto, podendo causar intoxicação por ingestão, inalação ou absorção direta (NOBREGA, H. F., 2014; SAVOY, V. L. T., 2011).

Os carbamatos, empregados como inseticidas, são ésteres de ácido metilcarbônico ou dimetilcarbônico, possuem média toxicidade, não sendo bioacumulados e, como os demais, provocam danos ao sistema nervoso. Por sua ação altamente cancerígena, têm sido proibidos em diversos países (NOBREGA, H. F., 2014; SAVOY, V. L. T., 2011).

Os pesticidas da classe das triazinas são utilizados como herbicidas, apresentam degradação lenta, podendo ser encontrados em leitos e corpos d'água e são altamente tóxicos, com evidência de ação carcinogênica. O principal representante é a atrazina, por possuir amplo campo de aplicação. Os piretroides apresentam baixa toxicidade em relação aos demais pesticidas e são uma alternativa ao uso dos clorados, que tiveram o uso proibido no Brasil, aos carbamatos e fosforados, no combate a insetos. Porém o uso destes também requer cuidados devido a efeitos em invertebrados, como peixes. Os pesticidas da classe dos cloroacetamidas são herbicidas empregados, principalmente, na cultura de soja e milho, sendo os principais representantes: alaclor, metolaclor e propalaclor (NOBREGA, H. F., 2014; SAVOY, V. L. T., 2011).

Os pesticidas também são classificados segundo seus efeitos toxicológicos, baseando no limite de dosagem letal de 50% (DL<sub>50</sub>) estabelecido. Ou seja, quantidade do composto, em miligramas, por quilograma (do indivíduo que ingeriu a substância), que é capaz de matar 50% da população de ratos ou animal teste. De acordo com a

classificação toxicológica, o pesticida deve apresentar uma faixa de cor específica na embalagem (Tabela 1.3) (BARRIGOSI, J. A. F., 2017).

Tabela 1.3: Classificação de toxicológica, segundo DL<sub>50</sub> e cor, da faixa no rótulo, específica para cada classe.

Classe	Classificação	DL <sub>50</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	Cor da faixa no rótulo da embalagem
I	Extremamente tóxico	≤ 50	Vermelho
II	Altamente tóxico	50 – 500	Amarelo
III	Medianamente tóxico	500 – 5000	Azul
IV	Pouco tóxico	> 5000	Verde

Segundo Art. 2º da 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, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências”, os pesticidas e afins são definidos como (BRASIL, 1989):

a) os produtos e os 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 implantadas, e de outros ecossistemas e também 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;

b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

No Brasil, a utilização de pesticidas se deu em meados de 1960, por influência do governo. A justificativa de modernizar a agricultura brasileira e aumentar a produtividade levou à chamada “Revolução Verde”. Medidas como o financiamento

bancário para compra de sementes vinculadas a aquisição de adubos e pesticidas, a partir da criação do Sistema Nacional de Crédito Rural, praticamente obrigou os produtores agrícolas a adotarem a prática de uso desses agentes em suas lavouras. Em 1975, foi criado o Programa Nacional de Defensivos Agrícolas, que oferecia subsídios para implantação de empresas nacionais e filiais de transnacionais de insumos agrícolas. O incentivo a prática do uso de pesticidas ainda existe, com políticas de isenções fiscais e tributárias no comércio destes produtos (LONDRES, F., 2011).

Todos esses fatores somados a falta de informação e preparo dos trabalhadores no manuseio destes produtos, além do esforço, a qualquer custo, para garantir e/ou aumentar a produtividade, fundamentaram a prática agrícola brasileira atual. Desde 2008 o Brasil lidera o *ranking* de maior consumidor mundial de pesticidas, de 2001 a 2008 o mercado de pesticidas passou de US\$ 2 bilhões para mais de US\$ 7 bilhões (MILHORANCE, F., 2015).

A preocupação com a presença de resíduos desses pesticidas nos alimentos é justificada pelos comprovados malefícios à saúde, que podem ser causados com a ingestão, mesmo que em pequenas quantidades, desses compostos (QUEIROZ, S. C. N., 2012). Por isso, os países se esforçam para desenvolver leis e fazer o controle dos produtos comercializados, tanto os produzidos no país de origem, quanto os importados.

A União Europeia (EU) com base no Regulamento (CE) Nº 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de fevereiro de 2005, estabeleceu os limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e em superfície de gêneros alimentícios destinados ao consumo humano ou animal, de origem vegetal ou animal (CE, 2005). Os países membros baseiam a legislação nacional nesse regulamento da Comunidade Europeia (CE).

Nos Estados Unidos, três órgãos são responsáveis por fiscalizar, regulamentar o uso e comércio de pesticidas. A *Environmental Protection Agency* é o órgão responsável por aprovar e estabelecer limites de resíduos nos alimentos em função do *Federal Food, Drug, and Cosmetic Act* e a *Food Drug Administration* (FDA), que fiscaliza e faz cumprir os limites estabelecidos. O país apresenta um o *Code of Federal Regulations*, neste código, revisado anualmente, estão contidas normas e regulamentos em grandes áreas de regulamentação federal, incluindo os pesticidas (GPO, 2017).

No Brasil, a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, é a base da legislação para pesticidas, sendo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o órgão responsável por regular e fiscalizar a presença destes contaminantes nos alimentos (BRASIL, 1989). Como o desenvolvimento de novos pesticidas é constante, são necessárias atualizações constantes. O registro de novos ativos é realizado pelo MAPA e a ANVISA avalia os riscos para a saúde. Os compostos permitidos e os limites máximos de resíduos (LMR) são publicados em documentos denominados Monografias Autorizadas para agrotóxicos no Brasil (ANVISA, 2017).

Segundo o balanço 2015, do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG), a cana-de-açúcar, matéria-prima da cachaça, é a segunda *commodity* que mais consome pesticidas no Brasil. Em 2015, foi responsável por 10% do valor total de vendas, sendo a soja a primeira, com 52% (SINDIVEG, 2016). O risco de contaminação indireta da cachaça existe, considerando que é necessária a moagem de 12, 5– 6,7 quilogramas de cana-de-açúcar na produção de um litro de cachaça artesanal e, 6,7–8,3 na produção de cachaça industrial (ANDRADE, L. A. B, 2006). Na literatura não foram encontrados estudos referentes à contaminação da cachaça por pesticidas. Entretanto, diante do considerável uso de pesticida na cultura de cana-de-açúcar, da elevada proporção entre, quantidade de cana-de-açúcar moída e volume da bebida produzido, e a toxicidade dos compostos ativos que compõem os pesticidas, a análise da cachaça se torna relevante.

### *1.3. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos: definição, origem, legislação e estudos da contaminação de bebidas*

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem um grupo de compostos que apresentam uma estrutura molecular de anéis aromáticos fundidos, sem presença de heteroátomo ou grupo substituinte. Os HPAs são classificados em leves e pesados. Os HPAs leves apresentam 2 ou 3 anéis benzênicos em sua estrutura e os HPAs pesados contém um número superior a 3 anéis benzênicos. A maior estabilidade dos HPAs pesados, em relação aos leves, confere a estes um maior grau de toxicidade (GARCIA, L. P., 2014).

A formação dos HPAs se dá por meio da combustão incompleta ou pirólise de matéria orgânica. As fontes responsáveis pela presença de HPAs no meio ambiente podem ser de origem antropogênica ou devido atividades naturais. As atividades da natureza que mais contribuem são: queimadas florestais espontâneas, emissões vulcânicas, decomposição de material biológico, além de síntese biogênica. As fontes antropogênicas podem ser várias, como exemplo, pode-se citar: atividades industriais que necessitem da queima de combustível (carvão, gás natural, madeira) para produção de energia ou aquecimento, o uso de combustível fóssil, queima florestal proposital, efluentes industriais e urbanos, fumaça de cigarro, defumação e secagem direta por madeira. A elevação dos teores de HPAs no meio ambiente se deu com o aumento das atividades industriais e, todas as mudanças na vida das populações depois do desenvolvimento industrial, indicando que as fontes antropogênicas são as principais responsáveis pela emissão destes compostos no meio ambiente (BETTIN, S. M., 2005; PISQ, 1998).

Os HPAs apresentam características lipofílicas, com propensão em se acumular em tecidos lipídicos dos seres vivos e, apesar da pequena afinidade com a água, estes podem ser adsorvidos em partículas em suspensão, presentes em ambientes aquáticos, e se transferirem, em algum momento, para sedimentos (LIN, D., 2005). Esses compostos se enquadram na classe dos poluentes orgânicos persistentes, classe de substâncias com propriedades tóxicas, sendo resistentes à degradação, bioacumulativos, que conseguem se transportar através do meio e se depositar em locais afastados do local de origem (EUGRIS, 2017). A necessidade de estudar, monitorar e controlar a presença, no ambiente e nos alimentos, justifica-se pelo elevado potencial carcinogênico e mutagênico de vários desses compostos (NETTO, A. D. P., 2000). A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer classifica alguns HPAs de acordo com a evidência de seu potencial carcinogênico (WHO/IARC, 2007).

Em 2002, uma seleção de 33 HPAs, os que mais apresentavam contaminação em alimentos, foi avaliada pelo Comitê Científico de Alimentos da Comissão Europeia, segundo informações fornecidas pelos países membros da EU. Dos compostos presentes nessa seleção, 15 compostos foram certificados como agentes carcinógenos e/ou genotóxicos (compostos capazes de alterar o material genético). Estes foram: benzo(a)antraceno (BaA), benzo(b)fluoranteno (BbFA), benzo(j)fluoranteno (BjFA), benzo(k)fluoranteno (BkFA), benzo(a)pireno (BaP), benzo(g,h,i)perileno (BghiP),

criseno (CHR), ciclopenta(c,d)pireno (CPP), dibenzo(a,h)antraceno (DBahA), dibenzo(a,e)pireno (DBaeP), dibenzo(a,h)pireno (DBahP), dibenzo(a,i)pireno (DBaiP), dibenzo(a,l)pireno (DBalP), indeno(1,2,3-c,d)pireno (IP) e 5-metilcriseno (MCH) (EU/SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 2002). Esses HPAs, classificados como carcinogênicos ou genotóxicos, integram a lista dos compostos investigados pelos membros da EU, seguindo a Recomendação 2005/108/CE da Comissão de 4 de fevereiro de 2005 (CE, 2005). O benzo(c)fluoreno (BcFL), posteriormente, também foi inserido nessa lista, por representar alto grau de toxicidade, segundo estudos *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (WHO/FAO, 2005). As estruturas desses 16 HPAs, que integram a listas dos 15 + 1 HPAs de prioridade de monitoramento da EU são apresentadas na Figura 1.1 (NIST PAH STRUCTURE INDEX, 2017):

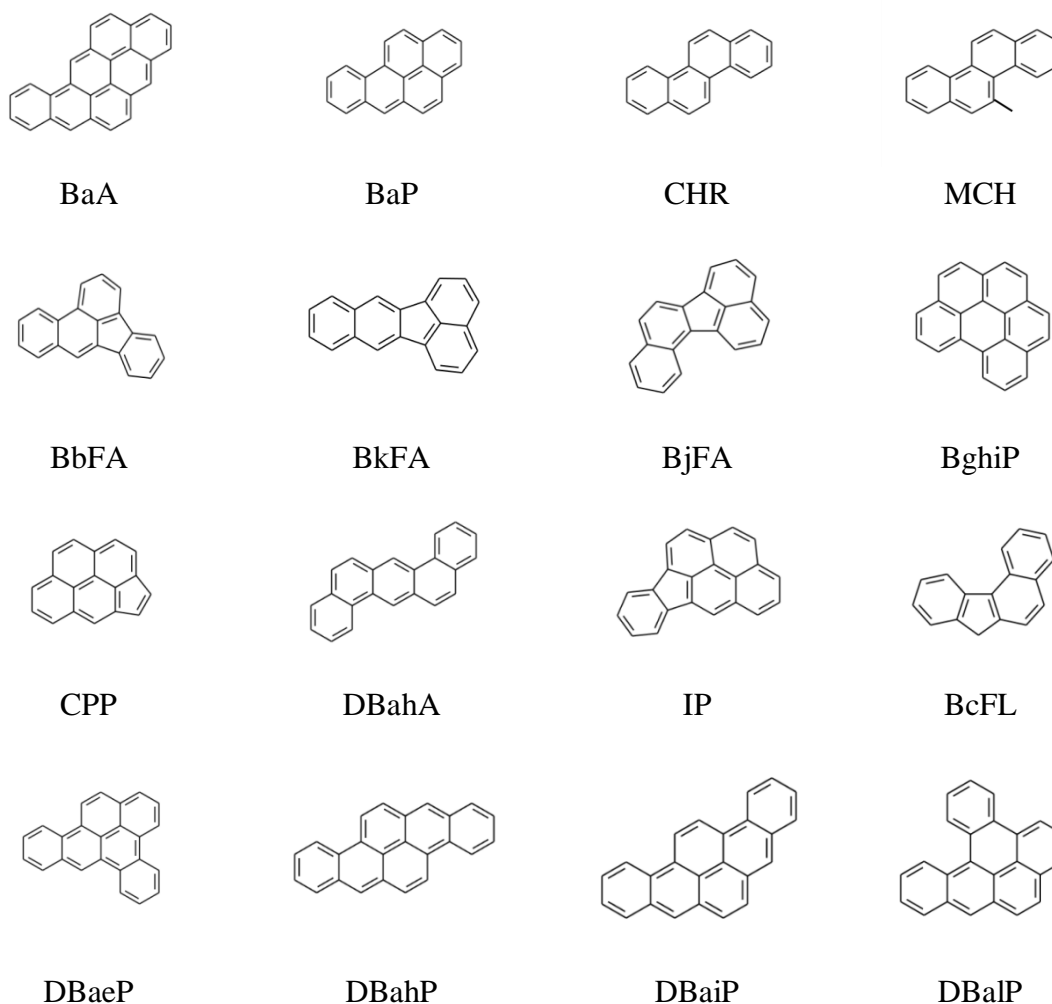


Figura 1.1: Estruturas moleculares dos 16 HPAs, que integram a listas dos 15 + 1 HPAs de prioridade de monitoramento da EU.

Os meios de possível contaminação por HPAs, em que o ser humano está sujeito, são o ar atmosférico e as bebidas aquosas. Os alimentos são considerados a principal via de exposição (WENZL, T., 2006). A contaminação dos alimentos pode se dar por transferência dos HPAs que estejam presentes no ar atmosférico, água ou solo e também formados durante processamento (secagem e defumação) e cozimento (grelhar, assar e fritar) (WENZL, T., 2006; CARUSO, M. S. F., 2008).

O regulamento da EU nº 835/2011, que altera o regulamento (CE) nº 1881/2006 em relação aos teores máximos de HPAs em alguns gêneros alimentícios, ressalta que os teores máximos devem ser seguros e representar os valores mais baixos possíveis (CE, 2011). A primeira legislação a respeito de controle da presença desses compostos em gêneros alimentícios, regulamento (CE) nº 208/2005, fixou o BaP como marcador indicativo da presença de HPAs nos gêneros alimentícios (CE, 2005). Com base num parecer do Painel Científico dos Contaminantes da Cadeia Alimentar, da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, que informava que a escolha do BaP como marcador para presença de HPAs não era adequada, o regulamento nº 835/2011 foi criado e alterações necessárias implantadas. Neste novo regulamento, novos teores máximos para a soma de quatro substâncias (PAH4) (BaP, BaA, BbFA e CHR) foram fixados e mantido um teor máximo diferenciado para o BaP (CE, 2011). Apesar de apresentar a legislação mais robusta, compreendendo diversos gêneros alimentícios, a legislação da EU não apresenta legislação específica para água ou qualquer tipo de bebida.

Nos Estados Unidos, a FDA não determina teor máximo de HPAs em nenhum gênero alimentício. O país trabalha no sentido de estabelecer leis de redução desses poluentes no meio ambiente (JACQUES, R. J. S., 2007).

O Brasil apresenta uma legislação modesta em relação ao controle de HPAs no campo alimentício. A ANVISA não possui legislação que definem os teores máximos de HPAs, em grande parte dos alimentos com potencial de contaminação. A legislação brasileira, para esse fim, pode ser resumida em três documentos, Portaria MS nº 2914 de dezembro de 2011 (que revoga a Portaria nº 518/2004), a Resolução RDC nº 274, de 22 de setembro de 2005 e RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. O primeiro documento estabeleceu limites para substâncias químicas que representam risco à saúde e cianotoxinas em água potável, dentre os quais, um limite de teor máximo de  $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$

de BaP. O mesmo limite foi fixado para águas envasadas e gelo, através da Resolução RDC nº 274, de 22 de setembro de 2005. A RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, estabeleceu o valor máximo de  $0,03 \mu\text{g kg}^{-1}$  de BaP em alimentos em que se utilizam aroma de fumaça no processamento (BRASIL, 2011; BRASIL, 2005; BRASIL, 2007). Ainda não existe legislação nacional que regulamenta o monitoramento para qualquer tipo de bebida.

Apesar das legislações, nacionais e internacionais, serem omissas quanto ao controle de HPAs em bebidas, alguns trabalhos relatam a contaminação. Galinaro, C. A. *et al.* (2009) analisaram amostras comerciais de cachaça, rum, uísque e álcool combustível. Todos os tipos de bebidas mostraram algum nível de contaminação, a soma dos teores de HPAs nas marcas de cachaça analisadas foi  $9,43 \mu\text{g L}^{-1}$ . Menezes, H. C. *et al.* (2015) detectaram concentrações numa faixa de 0,14 de fluoranteno a 5,7 de dibenzo(a,h)antraceno, em 29 amostras comerciais de cachaça artesanal. Tfouni, S. A. V. *et al.* (2007) avaliaram 25 amostras de cachaça de marcas comerciais e a soma dos teores de BaA, BbF, BkF, BaP e DahA chegou a  $1,91 \mu\text{g L}^{-1}$ . Bettin, S. M. *et al.* (2005) investigaram 28 amostras de aguardente e concluíram que a contaminação por HPAs em as amostras obtidas de cana-de-açúcar em que há queima do canavial para colheita são expressivamente maiores.

A contaminação da cachaça por HPAs pode ocorrer em variados momentos. Entre as possíveis fontes de contaminação, pode citar o emprego da prática da queima do canavial, realizada pelos produtores para facilitar a colheita da cana-de-açúcar e, o tipo de veículo utilizado no transporte da cana-de-açúcar, contaminando tanto por contato com graxas e óleos do veículo ou mesmo pela fumaça proveniente da combustão do combustível do veículo. No estado de São Paulo a Lei n. 11.241, de 19 de setembro de 2002, “dispõe sobre a eliminação gradativa da queima da palha da cana-de-açúcar e dá providências correlatas”, uma programação determinando a porcentagem máxima do canavial que pode ser queimada foi criada, para que os produtores tenham a possibilidade de se adaptarem, estabelecendo um prazo até 2031 para extinção da prática de queima (São PAULO, 2002). A contaminação também pode se dar no processamento da bebida, por contato casual com lubrificantes dos equipamentos, armazenamentos em reservatórios inadequados (por exemplo, revestidos com resina asfáltica), através do açúcar utilizado no processo e nos tonéis de madeira em que a

bebida é mantida durante o envelhecimento, que por serem tratados termicamente na sua confecção, podem conter HPAs (BETTIN, S. M., 2005).

Considerando o grande potencial tóxico da classe dos HPAs, com compostos de alto potencial carcinogênico e genotóxico, esforços devem ser realizados para ampliar o campo de controle. Legislações específicas para o maior número de gêneros alimentícios precisam ser fixadas, incluindo bebidas, para assegurar a qualidade alimentar da população, uma vez que a ameaça de contaminação por tipo de produto é verificada em estudos científicos.

#### *1.4. Métodos empregados na análise de pesticidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em bebidas*

O processo de destilação, na fabricação de bebidas alcoólica destiladas, elimina grande quantidade de substâncias advindas do vegetal de origem, agindo como uma etapa de limpeza. Essas bebidas têm em suas composições basicamente, água e etanol. A cachaça, por exemplo, apresenta um teor, em volume, maior que 51% em água, 38 a 48% em etanol e, menos de 1% em congêneres, sacarose e contaminantes. E, apesar da aparente simplicidade da matriz, essa pequena porcentagem, menor que 1% da amostra, pode conter mais de 250 compostos (ESPINOZA, L. J. S., 2006). Assim, a etapa de preparo de amostra se faz necessária para eliminar a presença de possíveis interferentes, garantir recuperação e precisão adequadas, realizar a pré-concentração dos analitos e preservar o equipamento de análise (MAJORS, R. E., 2015).

Nos métodos para determinação de pesticidas em bebidas destiladas, observou-se a predominância do uso técnicas de cromatografia, gasosa (GC) e líquida (HPLC), com os detectores de absorção na região do ultravioleta/visível (UV-vis), captura de elétrons (DCE), nitrogênio-fósforo N-40 (NPD) ou espectrometria de massas (MS) (HAN, Y., 2016; CABRAS, P., 1997; INOUE, T., 2010; WANG, Y., 2012; XU, H., 2016). Apenas um trabalho, realizado por Wang, J. *et al.* (2015) utilizaram a espectrofotometria de fluorescência. No preparo de amostras foi relatado o uso de diferentes procedimentos. Han, Y. *et al.* (2016) utilizaram o método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), com pré-evaporação para retirar a fração de etanol contida na amostra e adição de nanotubos de carbono com paredes

múltiplas, na etapa de *clean-up*. Cabras, P. *et al.* (1997) analisaram 11 pesticidas e fizeram o uso de três procedimentos de extração, cada um para um determinado grupo de pesticida: QuEChERS, evaporação da amostra com reconstituição com solvente orgânico para pré-concentração e extração líquido-líquido (LLE) com posterior pré-concentração. Inoue, T. *et al.* (2010) estudaram o poder da destilação na eliminação de resíduos de pesticidas, sendo a amostra filtrada em membrana de filtro PTFE (politetrafluoroetileno) e analisada. Wang, Y. *et al.* (2012) fizeram o uso de um procedimento de extração gás-sólido por nebulização pneumática (PN-GSE), no qual a amostra é transformada em aerossol e passada por uma coluna de óxido de alumínio, para posterior eluição com acetona. Xu, H. *et al.* (2016) utilizaram procedimento semelhante, microextração gás-sólido por nebulização pneumática (PN-GSME), com coluna de diatomito e eluição com acetato de etila. Wang, J. *et al.* (2012) produziram um polímero fluorescente de impressão molecular (FMIPs), a partir de 5(6)-isotiocianato e 3-aminopropiltriéoxissilano para detecção seletiva da  $\lambda$ -cicalotrina.

Na análise de HPAs, o uso de cromatografia, CG e HPLC, com detecção por fluorescência (FLD) ou MS, também é dominante. Assim como, no preparo de amostra, observa-se grande utilização das técnicas de extração em fase sólida (SPE) e LLE. A SPE com coluna de octadecil silano ( $C_{18}$ ) foi empregada por: Bettin, S. M. *et al.* (2005), para análise de aguardente utilizando acetato de etila para a eluição de compostos de maior massa e isopropanol para composto de menor massa. Machado, A. M. R. *et al.* (2014) fizeram o estudo da relação dos barris de envelhecimento da cachaça com a contaminação por HPAs, eluindo com acetato de etila. Galinaro, C. A. *et al.* (2007) analisaram cachaças produzidas a partir de cana-de-açúcar obtidas em locais em que há queima do canavial e sem queima do canavial. Os compostos foram eluídos com solução diclorometano:hexano (1:1, v/v). Galinaro, C. A. *et al.* (2009) utilizaram o procedimento anterior, para a presença de HPAs em cachaça, rum, uísque e álcool combustível. García-Facón, M. S. *et al.* (2005), com um procedimento utilizando duas minicolunas em série ( $C_{18}$  e sílica), investigaram as possíveis fontes de contaminação em aguardente de uva, rum, ponche, brandy de Jerez, uísque e vinho. Caruso, M. S. F. *et al.* (2009) compararam três procedimentos de extração para análise de benzo(a)pireno em cachaça, SPE (baseado no procedimento de Bettin, S. M. *et al.* (2005)), LLE com ciclohexano como solvente de extração e LLE com dimetilformamida:água (9:2, v/v). Tfouni, S. A. V. *et al.* (2007) utilizaram o procedimento de LLE anterior para análise de

5 HPAs em cachaça. Cacho, J. I. *et al.* (2016) avaliaram diferentes tipos de bebidas alcoólicas, incluindo uísques, gins, runs, brandies e tequila, utilizando a microextração emulsificada assistida por ultrassom (USAEME). Menezes, H. C. *et al.* (2015), analisaram cachaças artesanais através da técnica de microextração em fase sólida utilizando fibra resfriada e imersão direta (DI-CF-SPME). Por não haver legislação específica para a presença de HPAs em bebidas, os níveis de concentração que se busca alcançar, baseiam-se nos limites de matrizes legisladas, semelhantes ou que apresentam alguma relação com a matriz de estudo, no trabalho em questão. Portanto, os procedimentos supracitados apresentam uma etapa de pré-concentração, para atingir baixos níveis de detecção e possibilitar a análise desses compostos em concentrações compatíveis com as legisladas.

A Tabela 1.4 apresenta um resumo dos métodos descritos na literatura, para análise de pesticidas e HPAs, em bebidas alcoólicas destiladas. Analisando os resultados desses trabalhos (Tabela 1.4), verifica-se a importância do monitoramento, desses contaminantes em bebidas alcoólicas destiladas. Portanto, o desenvolvimento de um único procedimento para extração e *clean-up* de pesticidas e HPAs, em cachaça, é relevante, pois simplificaria o processo, reduzindo custos e tempo.

Tabela 1.4: Resumo dos métodos descritos na literatura para análise de pesticidas e HPAs em bebidas alcoólicas destiladas.

Matriz	Número de analitos	Extração	Método de análise	Faixa de trabalho Recuperação	Limite de quantificação	Referência
<b>LITERATURA PARA PESTICIDAS</b>						
Aguardente de Sorgo	5	QuEChERS	GC-MS/MS	5 – 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 88 – 112%	1 – 2,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	HAN, (2016)
Destilado de vinho	11	- QuEChERS; - pré-concentração; - LLE	- GC-NPD - GC-DCE - HPLC-UV/vis	Para CG-NPD e CG-DCE: 0,01 – 3,0 ppm Para HPLC-UV/vis: 0,01 – 1,5 ppm 86 – 115%	1 – 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$	CABRAS, (1997)
Destilado de Moromi	269	-	HPLC-MS/MS	5 – 200 $\text{ng mL}^{-1}$ Recuperação não informada	5 $\text{ng mL}^{-1}$	INOUE, (2010)
Licor	5	PN-GSE	HPLC-UV	0,80 – 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ 90 – 150%	0,63 – 0,87 $\mu\text{g L}^{-1}$	WANG, (2012)
Destilados de milho e sorgo	7	PN-GSME	HPLC-UV	5 – 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 96 – 107 %	0,27 – 0,78 $\mu\text{g L}^{-1}$	XU, (2016)
Água e destilado chinês	1	FMIPs	Espectrofotômetro de fluorescência	0 – 500 $\text{nmol L}^{-1}$ 61 – 106%	9,17 $\text{nmol L}^{-1}$	WANG, (2015)

Matriz	Número de analitos	Extração	Método de análise	Faixa de trabalho Recuperação	Limite de quantificação	Referência
<b>LITERATURA PARA HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS</b>						
Aguardente de cana-de-açúcar	16	SPE	HPLC-FLD	0,02 – 0,5 µg L <sup>-1</sup> 90 – 101%	0,1 - 1 µg L <sup>-1</sup>	BETTIN, (2005)
Cachaça	16	SPE	GC-MS	0,04 – 2,8 µg L <sup>-1</sup> Recuperações não fornecidas	0,20 – 0,30 µg L <sup>-1</sup>	MACHADO, (2014)
Cachaça	15	SPE	HPLC-FLD	15,2 – 504 µg L <sup>-1</sup> e 883 – 9400 µg L <sup>-1</sup> 81 – 113%	0,093 – 0,881 µg L <sup>-1</sup>	GALINARO, (2007)
Cachaça, rum, uísque e álcool combustível	15	SPE	HPLC-FLD	15,2 – 504 µg L <sup>-1</sup> e 883 – 9400 µg L <sup>-1</sup> 81 – 113%	0,093 – 0,881 µg L <sup>-1</sup>	GALINARO, (2009)
Aguardente de uva, rum, ponche, brandy de Jerez, uísque e vinho	7	SPE utilizando minicolunas (C <sub>18</sub> e sílica) em série - SPE	HPLC-FLD	0,02 – 2 µg L <sup>-1</sup> e 0,6 – 40 µg L <sup>-1</sup> 88 – 102%	0,5 – 6,0 µg L <sup>-1</sup>	GARCÍA- FALCÓN, (2005)
Cachaça	1	- LLE	HPLC-FLD	0,05 – 30 µg L <sup>-1</sup> 83 – 97%	0,10 µg L <sup>-1</sup>	CARUSO, (2009)

Matriz	Número de analitos	Extração	Método de análise	Faixa de trabalho Recuperação	Limite de quantificação	Referência
<b>LITERATURA PARA HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS</b>						
Cachaça	5	LLE	HPLC-FLD e GC-MS	0,6 – 3 µg L <sup>-1</sup> 70 – 96,7%	0,006 – 0,9 µg L <sup>-1</sup> *	TFOUNI, (2007)
Uísque, gin, rum, brandy e tequila	12	USAEME	GC-MS	0,04 – 2 µg L <sup>-1</sup> 84 – 118%	6 – 21 ng L <sup>-1</sup>	CACHO, (2016)
Cachaça	16	DI-CF-SPME	GC-MS	0,02 – 32,00 µg L <sup>-1</sup> 74 – 95%	0,02 – 0,22 µg L <sup>-1</sup>	MENEZES, (2015)

\*o valor refere-se a limite de detecção

## **2. OBJETIVO**

### *2.1. Objetivo geral*

Otimizar e validar métodos multirresíduos para determinação de 95 pesticidas e 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, em cachaça, por GC-MS/MS, utilizando um único procedimento de extração.

### *2.2. Objetivo específico*

I. Otimizar dois métodos de quantificação, por GC-MS/MS: um método multirresíduos para quantificação de 95 pesticidas e um método para quantificação dos 16 HPAs da lista de prioridade de investigação da União Europeia;

II. Otimizar um procedimento para extração e purificação dos pesticidas e HPAs em cachaça;

III. Validar os métodos desenvolvidos, com base no guia Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA de 2011 e, no guia Controle de Qualidade Analítica e, Procedimentos de Validação de Método para Análise de Resíduos de Pesticidas em Alimentos e Rações da Comissão Europeia de 2015;

IV. Realizar a análise de amostras de cachaças comerciais e das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”, de algumas amostras, para verificar se há contaminação com resíduos de pesticidas e HPAs.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Equipamentos e materiais

Os equipamentos e materiais utilizados, que se encontram no LANAGRO/MG em Pedro Leopoldo, estão indicados na Tabela 3.1:

Tabela 3.1: Equipamentos e materiais utilizados no desenvolvimento e validação dos métodos.

Equipamentos e Materiais	Descrição
Sistema GC-MS/MS	Agilent 7000A triploquadropolo GC-MS/MS com fonte de ionização por impacto de elétrons
Pré-coluna cromatográfica para separação dos pesticidas	Rtx-OPPesticides Restek, 2 m x 0,25 mm x 0,25 μm
Coluna cromatográfica para separação dos pesticidas	Rtx-OPPesticides Restek, 15 m x 0,25 mm x 0,25 μm
Coluna cromatográfica para separação dos HPAs	Agilent J&W DB-EUPAH, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm
Agitador tipo Vortex	Labnet, modelo VX-200
Balança analítica	Shimadzu, modelo AUY220, capacidade de 220g e sensibilidade 0,1 mg
Sistema de purificação de água	Merck Millipore, Simplicity System
Banho termostaticado com agitação constante	Yamato, modelo BT-25, faixa de 20 – 110 °C
Centrífuga	Thermo Scientific modelo Megafuge 40R refrigerado

#### 3.2. Padrões, solventes, sais, cartuchos e amostras

Os padrões de todos os pesticidas foram adquiridos da Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha). Solução padrão com mistura de 16 HPAs, na concentração de 250 mg L<sup>-1</sup> em acetona/cloreto de metileno (80:20, v/v), foi adquirida da Agilent Technologies (Santa Clara, Estados Unidos). Diclorometano (99,8%), grau de pureza

HPLC, adquirido da Scharlau (Barcelona, Espanha). Acetato de etila (99,8%) e acetonitrila (99,9%), ambos grau de pureza HPLC, foram adquiridos da Tedia (Fairfield, Estados Unidos). Nonano ( $\geq 99,0\%$ ), grau de pureza GC, foi adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Estados Unidos). Sulfato de magnésio anidro P.A. (98%) foi adquirido da Vetec (Saint Louis, Estados Unidos). Cloreto de sódio (99%) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Estados Unidos). Cartuchos de EFS Spe-ed octadecil C18/18% (1000 mg/6 mL) foram adquiridos da Applied Separations (Allentown, Estados Unidos). As amostras de cachaças utilizadas no desenvolvimento e validação dos métodos foram produzidas e fornecidas por um alambique da região de Ubá, Minas Gerais. Amostras de cachaças comerciais foram adquiridas em mercado local e também por meio de doação de produtores das regiões de Ouro Branco e Itaverana. Amostras das frações “cabeça”, “coração” e “cauda” de destilação foram adquiridas através de doação dois alambiques, um da região de Ubá e outro de Ouro Branco. Essas amostras comerciais e frações (Tabela 3.2) foram analisadas após validação dos métodos.

Tabela 3.2: Relação de amostras comerciais e frações de destilação da cachaça analisadas pelos métodos desenvolvidos.

Código	Amostra
A1	Cachaça da região de Ubá, com envelhecimento
A2	Fração de “cauda” do alambique da região de Ubá
A3	Fração de “cabeça” do alambique da região de Ubá
A4	Fração de “coração” do alambique da região de Ubá
A5	Cachaça da região de Ouro Branco envelhecida em tonel de amburana
A6	Cachaça da região de Ouro Branco envelhecida em tonel de freijó
A7	Cachaça da região de Ouro Branco envelhecida em tonel de amendoim
A8	Cachaça da região de Ouro Branco envelhecida em tonel de amburana
A9	Cachaça da região de Ouro Branco envelhecida em tonel de carvalho
A10	Cachaça da região de Ouro Branco envelhecida em tonel de bálsamo
A11	Cachaça da região de Ouro Branco envelhecida em tonel de carvalho
A12	Cachaça da região de Ouro Branco armazenadas em dornas de inox
A13	Cachaça da região de Belo Horizonte, sem envelhecimento
A14	Cachaça da região de Paraty envelhecida em tonel de jequitibá

Código	Amostra
A15	Cachaça da região de Perdões envelhecida em tonel de carvalho
A16	Cachaça da região de Nova União envelhecida em tonel de amburana
A17	Cachaça da região de Paraty envelhecida em tonel de carvalho
A18	Cachaça da região de Itaverana envelhecida em tonel de amburana, por 2 anos
A19	Cachaça da região de Itaverana armazenadas em dornas de inox, por 2 meses
A20	Cachaça da região de Itaverana envelhecida em tonel de amburana, por 1 anos
A21	Cachaça da região de Itaverana envelhecida em tonel de carvalho americano
A22	Cachaça da região de Itaverana envelhecida em tonel de jequitibá
A23	Cachaça da região de Itaverana envelhecida em tonel de carvalho europeu
A24	Fração de “cauda” do alambique da região de Ouro Branco
A25	Fração de “cabeça” do alambique da região de Ouro Branco
A26	Fração de “coração” do alambique da região de Ouro Branco

### 3.3. Preparo das soluções

#### 3.3.1. Soluções estoque e de trabalho dos pesticidas

Para o preparo de 10 mL das soluções estoques, pesou-se cerca 16 a 20 mg de cada padrão de pesticida e dissolveu em acetonitrila, armazenando-as em frascos de vidro âmbar sob refrigeração à -20°C. As concentrações variam em uma faixa de 1500 a 2000 mg L<sup>-1</sup>, considerando o valor pesado e a pureza de cada padrão. Soluções de trabalho contendo mistura de todos os pesticidas foram preparadas nas concentrações 1, 2, 5 e 10 mg L<sup>-1</sup>, a partir da diluição das soluções estoque em acetonitrila.

#### 3.3.2. Solução estoque e de trabalho dos pesticidas e dos HPAs

Para o preparo de 10 mL de solução estoque dos HPAs (4 mg L<sup>-1</sup>), adicionou-se 160 µL da solução padrão dos HPAs (250 mg L<sup>-1</sup>) e completou-se o volume com nonano. Soluções de trabalho, nas concentrações de 0,25 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>, foram preparadas a partir da diluição da solução estoque, sendo o volume completado com acetato de etila.

### 3.4. Condições espectrométricas

As condições espectrométricas dos pesticidas e dos HPAs foram otimizadas a partir da injeção de soluções de cada padrão (10 mg L<sup>-1</sup>) no modo varredura, para determinação dos íons precursores e dos tempos de retenção. Em seguida, realizou-se a injeção de solução de cada padrão (10 mg L<sup>-1</sup>) utilizando diferentes energias de colisão (5, 15, 25 e 35 eV) e monitorou-se os íons produtos formados na fragmentação, no modo varredura na faixa de 50-500 *m/z*. A energia de colisão selecionada para cada transição foi posteriormente otimizada para obtenção de sinal mais intenso. Para confirmação da identidade dos íons, precursores e produtos, comparou-se os espectros referentes aos picos dos íons obtidos nas injeções dos padrões e os encontrados na biblioteca do equipamento (NIST08 Mass Spectral Library), além de informações na literatura sobre os íons comumente utilizados para identificação desses analitos.

Os íons foram selecionados buscando simultaneamente maior *m/z* e abundância.

### 3.5. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas para o método de separação dos pesticidas foram baseadas inicialmente no método do Lanagro/MG (MET/LP/PL/011: “Metodologia de análise de resíduos de pesticidas por GC-MS/MS”). Modificações na rampa de aquecimento e tempo de corrida foram realizadas para obter melhor separação entre os analitos, devido à inclusão de novos pesticidas. A etapa 6 (280 – 310 °C a 20 °C min<sup>-1</sup>) foi incorporada na programação de forno (Tabela 3.3) para análise de analitos de maior retenção o que demandou um acréscimo de 6 minutos no tempo final de corrida.

O método de separação dos HPAs foi desenvolvido utilizando uma coluna específica para análise de HPAs de 3, 4 e 5 anéis de benzeno (coluna CG J&W Agilent DB-EUPAH 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A rampa de aquecimento, do forno e do injetor, e a vazão do gás de arraste foram otimizadas para análise de HPAs com mais de 5 anéis de benzeno na estrutura. A etapa 2 (40 – 200 °C a 70 °C min<sup>-1</sup>) na programação de forno (Tabela 3.3) foi configurada para maximizar a diferenciação dos isômeros, tendo como fundamentos a seção de choque, maior frequência de choques com a fase estacionária e interação com fase estacionária levemente distinta entre os mesmos.

Nos dois métodos foi utilizado hélio grau 6.0, pureza mínima de 99,9999% adquirido da White Martins (Belo Horizonte, Brasil) como gás de arraste e nitrogênio como gás de colisão, volume de injeção de 25 µL no modo de injeção *solvent vent*. No espectrômetro, empregou-se ionização por impacto de elétrons (70 eV), temperatura da fonte de 300°C e dos quadrupolos de 180°C. As condições cromatográfica otimizadas para cada método estão descritas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Condições cromatográficas otimizadas para o método de análise de pesticidas e método de análise de HPAs.

MÉTODO CROMATOGRÁFICO	
Pesticidas	HPAs
PROGRAMAÇÃO DE FORNO	
Temperatura inicial: 40 °C (1) 40 °C por 0,1667 min; (2) 40 – 50 °C a 75 °C min <sup>-1</sup> ; (3) 50 – 150 °C a 50 °C min <sup>-1</sup> ; (4) 150 – 200 °C a 6 °C min <sup>-1</sup> ; (5) 200 – 280 °C a 10 °C min <sup>-1</sup> ; (6) 280 – 310 °C a 20 °C min <sup>-1</sup> .	Temperatura inicial: 40 °C (1) 40 °C por 1,8 min; (2) 40 – 200 °C a 70 °C min <sup>-1</sup> ; (3) 200 – 240 °C a 6 °C min <sup>-1</sup> ; (4) 240 – 280 °C a 10 °C min <sup>-1</sup> ; (5) 280 – 310 °C a 6 °C min <sup>-1</sup> .
PROGRAMAÇÃO DE INJEÇÃO	
(1) 45 °C por 1,37 min (2) 45 – 325 °C a 600 °C min <sup>-1</sup> .	
PROGRAMAÇÃO DE VAZÃO	
(1) 0 – 18,23 min: 1 mL min <sup>-1</sup> ; (2) 18,23 – 27,25 min: 1,2 mL min <sup>-1</sup> ; (3) 27,25 – 37 min: 2 mL min <sup>-1</sup> .	(1) 0 – 1,37 min: 1 mL min <sup>-1</sup> ; (2) 1,37 – 2,03 min: 3 mL min <sup>-1</sup> ; (3) 2,03 – 18,23 min: 1 mL min <sup>-1</sup> ; (4) 18,23 – 59 min: 1,2 mL min <sup>-1</sup> .
COLUNA	
Pré-coluna capilar: 2 m x 0,25 mm x 0,25µm Rtx-OPPesticides Restek Coluna capilar: 15 m x 0,25 mm x 0,25 µm Rtx-OPPesticides Restek	Coluna capilar: 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm Agilent J&W DB-EUPAH

### *3.6. Procedimento otimizado de extração líquido-líquido*

A extração dos pesticidas e HPAs utilizando a extração líquido-líquido seguiu o procedimento otimizado descrito:

- 1) Mediu-se 20 mL de cachaça, transferiu-se para um tubo de centrifugação de 50 mL (às amostras fortificadas, adicionou-se os volumes adequados das soluções de trabalho);
- 2) Evaporou-se aproximadamente 40% do volume da amostra em banho à 60 °C, sob fluxo de ar comprimido;
- 3) Adicionou-se 1 g de NaCl e agitou-se por 1 minuto em vortex;
- 4) Adicionou-se 10 mL de diclorometano e agitou-se por 1 minuto em vortex;
- 5) Recolheu-se a fase inferior (fase orgânica) e transferiu-se para outro tubo de centrifugação de 50 mL;
- 6) Evaporou-se o extrato até completa secura em banho à 38 °C, sob fluxo de ar comprimido;
- 7) Retomou-se com 1 mL de acetato de etila;
- 8) Transferiu-se 900 µL para frasco amostrador e injetou-se no sistema GC-MS/MS.

### *3.7. Procedimento otimizado da extração em fase sólida*

O procedimento otimizado para extração dos pesticidas e HPAs por meio da SPE cumpriu as etapas:

- 1) Mediu-se 20 mL de cachaça, transferiu-se para um tubo de centrifugação de 50 mL (às amostras fortificadas, adicionou-se os volumes adequados das soluções de trabalho);
- 2) Evaporou-se aproximadamente 40% do volume da amostra em banho à 60 °C, sob fluxo de ar comprimido;
- 3) Transferiu-se a amostra para um cartucho C<sub>18</sub> (previamente condicionado com 10 mL de metanol e 10 mL de água ultrapura) numa vazão aproximada de 1 a 2 mL min<sup>-1</sup> e deixou-se secar por 10 minutos;

- 4) Percolou-se 5 mL de água ultrapura, etapa de limpeza, e deixou-se secar por 10 minutos;
- 5) Eluiu-se com 15 mL de diclorometano e coletou-se o extrato;
- 6) Evaporou-se o extrato até completa secura em banho à 38 °C, sob fluxo de ar comprimido;
- 7) Retomou-se com 1 mL de acetato de etila;
- 8) Transferiu-se 900 µL para frasco amostrador e injetou-se em sistema GC-MS/MS.

### *3.8. Procedimento otimizado de extração líquido-líquido com adição de sais*

- 1) Mediu-se 20 mL de cachaça, transferiu-se para um tubo de centrifugação de 50 mL (às amostras fortificadas, adicionou-se os volumes adequados das soluções de trabalho);
- 2) Adicionou-se 10 mL de diclorometano;
- 3) Agitou-se por 1 minuto em vortex;
- 4) Adicionou-se 1 g de NaCl e 6 g de MgSO<sub>4</sub>;
- 5) Agitou-se por 1 minuto em vortex;
- 6) Centrifugou-se por 10 minutos a 4000 rpm;
- 7) Recolheu-se 8 mL da fase superior (fase orgânica) e transferiu-se para outro tubo de centrifugação de 50 mL;
- 8) Evaporou-se o extrato até completa secura em banho à 38 °C, sob fluxo de ar comprimido;
- 9) Retomou-se com 1 mL de acetato de etila;
- 10) Transferiu-se 900 µL para frasco amostrador e injetou-se em sistema GC-MS/MS.

### 3.9. Otimização da extração líquido-líquido

Para avaliar e otimizar a extração líquido-líquido foi realizado um planejamento fatorial  $2^2$ , avaliando os fatores: evaporação da fração do etanol da cachaça e tipo de solvente de extração (Tabela 3.4).

Tabela 3.4: Planejamento fatorial  $2^2$  para avaliação e otimização da extração líquido-líquido.

Fator		Nível	
		-1	+1
A	Evaporação	Com evaporação	Sem evaporação
B	Solvente	Acetato de etila	Diclorometano

As 4 combinações necessárias para realização do planejamento fatorial  $2^2$  estão apresentadas na Figura 3.1. Os 4 ensaios foram realizados em duplicata.

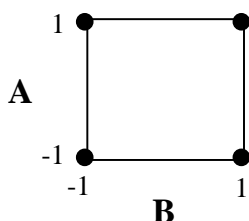


Figura 3.1: Esquema das combinações de extrações realizadas para o planejamento  $2^2$ .

### 3.10. Otimização da extração em fase sólida

Para obter as melhores condições da SPE foi realizado um planejamento fatorial Box-Behnken  $3^3$ . Os fatores estudados foram: porcentagem de amostra evaporada na etapa inicial, volume de água ultrapura na etapa de limpeza e volume de diclorometano na etapa de extração (Tabela 3.5).

Tabela 3.5: Planejamento fatorial Box-Behnken  $3^3$  para avaliação e otimização da SPE.

Fator		Nível		
		-1	0	+1
A	Porcentagem de evaporação da amostra (%)	0	40	75
B	Volume de água na etapa de limpeza (mL)	0	5	10
C	Volume de diclorometano (mL)	10	15	20

Os ensaios necessários para realização do planejamento Box-Behnken  $3^3$  estão apresentados na Figura 3.2, sendo o ponto central realizado em triplicata.

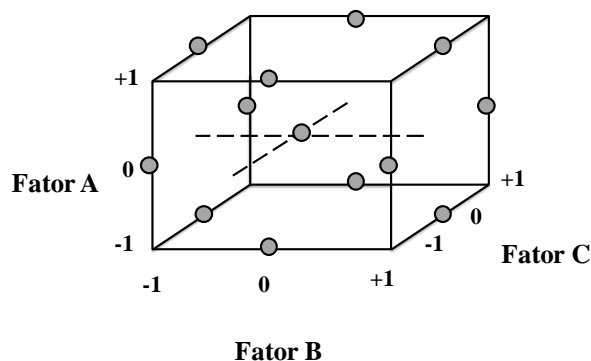


Figura 3.2: Representação do planejamento fatorial Box-Behnken  $3^3$ .

### 3.11. Otimização da extração líquido-líquido com adição de sais

A extração pelo método de extração líquido-líquido com adição de sais foi avaliado e otimizado utilizando um planejamento fatorial  $2^2$ . No planejamento foram estudados os fatores: volume de solvente de extração e tipo solvente de extração (Tabela 3.6).

Tabela 3.6: Planejamento fatorial  $2^2$  realizado na otimização da extração pelo método de extração líquido-líquido com adição de sais.

Fator		Nível	
		-1	+1
A	Volume de solvente de extração (mL)	10	20
B	Tipo de solvente	Acetonitrila	Diclorometano

O planejamento foi realizado contemplando as 4 combinações possíveis (Figura 3.1), em duplicada.

### *3.12. Comparação dos procedimentos de extração otimizados*

Após a otimização dos três procedimentos de extração, foi realizado um estudo para determinar o método que fornecia resultados mais satisfatórios, em recuperação e repetibilidade.

Para comparação dos procedimentos de extração otimizados, curvas de calibração matrizadas e amostras fortificadas de pesticidas foram preparadas, em triplicata, nos níveis: 0,001, 0,005, 0,010 e 0,025 mg L<sup>-1</sup>.

### *3.13. Expansão do procedimento de extração líquido-líquido com adição de sais para determinação dos HPAs*

O procedimento de extração otimizado, que forneceu resultados mais satisfatórios para os pesticidas, em termos de recuperação e repetibilidade, foi avaliado quanto sua eficiência e adequação para a extração dos HPAs, utilizando os mesmos parâmetros estatísticos.

Para realizar essa avaliação, foram preparadas curvas de calibração nos níveis: 0,001, 0,0025, 0,005, 0,0075 e 0,01 mg L<sup>-1</sup> e amostras fortificadas no nível 0,001 mg L<sup>-1</sup>, ambos em sextuplicata, para cada HPA.

### *3.14. Validação dos métodos empregando extração líquido-líquido com adição de sais*

A validação foi conduzida seguindo o Manual de Garantia e Qualidade Analítica do MAPA e, o Documento Guia em Controle de Qualidade Analítica e Procedimentos de Validação de Método para Análise de Resíduos de Pesticidas em Alimentos e Rações da Comissão Europeia (BRASIL, 2011; SANTE, 2015). Os parâmetros de desempenho foram avaliados para certificação do cumprimento dos critérios mínimos de aceitação. Os parâmetros de validação avaliados foram: linearidade, veracidade, precisão

(repetibilidade e precisão intermediária), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e incerteza de medição.

Segundo o Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA, a faixa de trabalho deve ser estabelecida de modo a contemplar o LMR ou, no caso de não haver um limite permitido definido, o Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR) (BRASIL, 2011). Neste trabalho, a matriz estudada, cachaça, não apresenta regulamentação quanto à presença de pesticidas e HPAs. Por isso, as faixas de trabalho foram estabelecidas com base na faixa linear do equipamento e nos LMRs dos analitos regulamentados por órgãos de fiscalização, nacional e internacionais, para cana-de-açúcar (CE, 2005; GPO, 2017; ANVISA, 2017; CE, 2011; BRASIL, 2011; BRASIL, 2005; BRASIL, 2007). Para os pesticidas a faixa de trabalho definida foi de 0,01 – 0,1 mg L<sup>-1</sup> e para os HPAs de 0,001 – 0,01 mg L<sup>-1</sup>.

#### 3.14.1. Linearidade

Na avaliação da linearidade foram construídas curvas de calibração matrizada, seguindo o procedimento descrito no item 3.8. As curvas foram preparadas em 5 níveis de concentração, todos em sextuplicata, a partir de extrações independentes em cada ponto. Os níveis de concentração para os pesticidas foram: 0,01, 0,025, 0,05, 0,075 e 0,1 mg L<sup>-1</sup> e para os HPAs foram: 0,001, 0,0025, 0,005, 0,0075 e 0,01 mg L<sup>-1</sup>. O procedimento foi realizado em três diferentes dias. A linearidade foi avaliada através do coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) da curva, do teste t (Equação 3.1) e da análise da variância (ANOVA).

$$t_{calculado} = \sqrt{R^2} \sqrt{\frac{n-2}{1-R^2}} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

#### 3.14.2. Veracidade e precisão

A veracidade e precisão (repetibilidade e precisão intermediária) foram avaliadas através de amostras fortificadas em três níveis de concentração. Para avaliação dos pesticidas, as amostras foram fortificadas nos níveis de concentração: 0,01, 0,05 e 0,1

mg L<sup>-1</sup> e para avaliação dos HPAs em: 0,001, 0,005, e 0,01 mg L<sup>-1</sup>. As áreas dos picos de cada analito foram interpoladas na curva matrizada apropriada para determinação da concentração. A veracidade foi avaliada pela recuperação (R), que foi estimada através da razão da concentração calculada pela concentração adicionada. Cada nível de concentração das amostras fortificadas foi preparado em sextuplicata, para avaliar a repetibilidade através do coeficiente de variação (CV). O mesmo procedimento foi realizado em três diferentes dias para avaliar a precisão intermediária através do CV.

### 3.14.3. Limites de detecção e quantificação dos métodos

O LD, de cada método, foi determinado experimentalmente, através de injeção de amostras fortificadas nas concentrações 0,001, 0,0025, 0,005 e 0,075 mg L<sup>-1</sup>, para os pesticidas e 10 vezes mais diluídas para os HPAs. A concentração que forneceu identificação inequívoca do sinal de todos os analitos estudados, com simetria similar dos picos cromatográficos e razão sinal/ruído maior que três, foi selecionada como LD.

O LQ, de cada método, foi estabelecido como o menor nível de concentração da curva de calibração, na qual os critérios de veracidade (recuperação entre 70 – 120%) e precisão (CV ≤ 20%) foram atendidos.

### 3.14.4. Incerteza de medição

A incerteza de medição, segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia, é “parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas” (INMETRO, 2012). A norma ISO/IEC 17025 recomenda a avaliação da incerteza de medição ou, pelo menos que, os componentes mais relevantes sejam considerados (ABNT, 2005). A incerteza de medição (Equação 3.2) foi obtida a partir do cálculo da incerteza combinada ( $u_{comb}$ ) que, neste trabalho, foi estimada considerando as incertezas advindas da curva de calibração ( $u_{calib}$ ) e da precisão intermediária ( $u_{PI}$ ).

$$u_{comb} = x_n \sqrt{u_{calib}^2 + u_{PI}^2} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

A incerteza devido à curva de calibração (Equação 3.3) envolve as incertezas provenientes: da resposta instrumental ( $s^2(y_n)$ ), da inclinação ( $s^2(b)$ ), intercepto ( $s^2(a)$ ) e covariância entre intercepto e a inclinação da curva de calibração ( $cov(a, b)$ ).

$$u_{calib} = \sqrt{\frac{s^2(y_n) + s^2(a) + x_n^2 s^2(b) + 2x_n cov(a, b)}{b^2}} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

A incerteza em consequência da precisão intermediária (Equação 3.4) foi estimada pela razão do desvio padrão das recuperações ( $s_R$ ) obtidas nos três dias de validação pela média das recuperações ( $\bar{R}$ ), multiplicada pelo número total ( $N$ ) de ensaios, por nível, realizados nos três dias de validação. A  $u_{PI}$  foi estimada para os três níveis de concentração, nos quais a veracidade e a precisão foram avaliadas.

$$u_{PI} = \frac{s_R}{\bar{R}N} \quad (\text{Eq. 3.4})$$

### 3.15. Análise de amostras comerciais de cachaça e frações de “cabeça”, “coração” e “cauda” de destilação

Após validação dos métodos, para determinação dos pesticidas e HPAs, 20 amostras comerciais produzidas em 7 alambiques e frações de “cabeça”, “coração” e “cauda” de destilação de dois alambiques foram analisadas. A obtenção dessas frações foi realizada através da diferenciação do ponto de ebulição, chamado ponto de corte das frações. A fração “cabeça” apresenta ponto de ebulição superior ao do etanol e a fração “cauda” ponto de ebulição inferior ao do etanol.

Na análise das amostras, curvas de calibração matrizadas e amostras fortificadas, utilizando uma matriz branca (previamente analisada e certificada como branca), foram preparados. O preparo das curvas de calibração foi realizado através da contaminação com as soluções de trabalho de pesticidas e de HPAs, adicionando volumes adequados para cada nível da faixa de trabalho, a curva de cada analito foi obtida através da interpolação das áreas de cada pico nas concentrações fixadas. As curvas foram preparadas nos níveis: 0,01, 0,025, 0,05, 0,075 e 0,1 mg L<sup>-1</sup> e os fortificados, utilizados para certificar que a adequação das recuperações do dia de análise, foram preparados

nos níveis: 0,01, 0,025, 0,05 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>, para os pesticidas. As curvas e amostras fortificadas, para os HPAs, foram preparadas em concentrações dez vezes mais diluídas.

As extrações para o preparo das curvas e das amostras fortificadas foram realizadas juntamente com as extrações das amostras de cachaça comercial e frações de destilação. As injeções foram feitas, simultaneamente, em sequência aleatória, sendo os extratos referentes às curvas e amostras fortificadas, injetados três vezes.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Condições espectrométricas

Nos dois métodos otimizados, para análise de pesticidas e HPAs, os analitos estudados foram determinados utilizando o modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM) por GC-MS/MS. Para cada analito foram selecionadas duas transições para monitoramento, a transição com maior razão  $m/z$  foi definida como transição de quantificação e, a segunda transição com melhor resposta, definida como transição de confirmação. Os critérios: razão  $m/z$  maior ou igual a 3:1, para ambas transições, intensidades relativas entre os picos e variabilidade das intensidade relativas foram verificadas quanto a adequação às regras de desempenho, requeridas no Manual de Garantia e Qualidade Analítica do MAPA (Tabela 4.1) (BRASIL, 2011).

Tabela 4.1: Critérios para definição das transições de quantificação e confirmação.

Intensidade relativa (% da transição de quantificação)	Variabilidade máxima das intensidades relativas (%)
Maior que 50	$\pm 20$
20 – 50	$\pm 25$
10 – 20	$\pm 30$
Menor ou igual a 10	$\pm 50$

Os pesticidas e HPAs analisados, seus respectivos tempos de retenção, transição de quantificação, transição de confirmação e energia de colisão para cada transição são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Lista de pesticidas e HPAs analisados, com seus respectivos tempo de retenção, transição de quantificação, transição de confirmação e energia de colisão para cada transição.

Analito	Tempo de retenção (min)	Transição 1 (quantificação) (m/z)	EC1	Transição 2 (confirmação) (m/z)	EC2
Método de pesticidas					
Tiobencarbe	6,027	100,0 – 55,0	25	100,0 – 72,0	5
Diclorvós	6,545	185,0 – 93,0	15	185,0 – 109,0	15
Metamidofós	6,851	141,0 – 95,0	6	141,0 – 79,0	15
Carbofurano	6,894	164,0 – 149,1	15	164,0 – 131,0	15

Analito	Tempo de retenção (min)	Transição 1 (quantificação) (m/z)	EC1	Transição 2 (confirmação) (m/z)	EC2
Dissulfotona sulfona	7,243	186,0 – 97,1	15	186,0 – 81,0	20
2,4-D	7,336	174,6 - 146,9	15	144,6 – 109,0	5
Mervinfós	8,066	191,9 – 127,0	10	127,0 – 109,0	10
Trifluralina	10,147	305,5 – 264,2	5	305,5 – 160,0	25
Fenobucarbe	10,186	150,0 – 121,0	10	121,0 – 77,0	18
Etoprofós	10,474	158,2 – 97,0	15	200,1 – 158,0	5
Benfluralina	10,488	292,0 – 264,0	5	292,0 – 206,0	15
Promecarbe	11,378	149,9 – 135,1	15	149,9 – 91,0	25
Dissulfotona	11,662	88,1 – 60,0	5	88,1 – 59,0	25
Dicloran	12,221	206,0 – 175,9	15	206,0 – 148,0	25
Quintozeno	12,464	236,5 – 117,0	25	236,5 – 119,1	25
Heptacoloro	12,465	235,0 – 141,0	25	235,0 – 117,0	35
Dicamba	12,516	173,0 – 145,0	15	173,0 – 109,0	35
HCH beta	12,583	180,5 – 145,2	15	218,5 – 183,1	15
Simazina	12,734	173,0 – 138,1	5	173,0 – 110,1	15
HCH gama	13,037	180,5 – 145,2	15	218,5 – 183,1	15
Etrinfós	13,093	181,0 – 153,0	6	292,0 – 181,0	16
Espiroxamina	13,357	144,0 – 100,0	15	198,0 – 126,0	5
Iprobenfós	13,442	204,0 – 171,0	2	204,0 – 122,0	10
Pirimicarbe	13,791	238,0 – 166,0	20	166,0 – 96,0	15
Diclorofluanida	13,794	167,0 – 124,0	5	167,0 – 97,0	25
Vinclosolina	14,132	284,5 – 212,2	15	197,4 – 145,2	35
Clorpirifós metil	14,217	288,0 – 93,0	25	288,0 – 273,0	15
Alacloro	14,287	237,0 – 160,0	15	188,1 – 160,1	10
Metribuzina	14,447	198,0 – 82,1	15	198,0 – 110,0	15
Tolclorfós metil	14,451	264,5 – 250,2	25	264,5 – 93,2	15
Fenclorfós	14,473	284,4 – 270,1	30	284,9 – 269,9	15
Prometryn	14,668	241,2 – 183,9	10	241,0 – 199,0	10
Ametrina	14,675	227,2 – 170,1	20	227,2 – 152,1	20
Pirimifós metil	14,863	290,1 – 125,0	25	290,1 – 233,0	10
Clorotalonil	14,901	266,0 – 231,0	25	265,2 – 231,0	25
Aldrin	14,902	257,0 – 222,0	25	262,5 – 193,1	12
Bentazona	14,983	198,0 – 92,0	25	119,0 – 92,0	10
Fenitrotiona	15,105	277,0 – 260,0	5	277,0 – 109,0	5
Paration etil	15,51	291,1 – 109,0	10	291,1 – 81,0	40
Tetraconazol	15,692	336,0 – 218,0	25	336,0 – 204,0	35
Pirimifós etil	15,771	318,1 – 182,1	15	318,1 – 166,1	15
Isodrin	15,773	262,8 – 193,0	35	192,9 – 123,0	35
Bromofós metil	15,823	330,9 – 315,9	20	331,0 – 93,0	10
Clorpirifós	15,847	313,8 – 258,0	5	314,0 – 286,0	5

Analito	Tempo de retenção (min)	Transição 1 (quantificação) (m/z)	EC1	Transição 2 (confirmação) (m/z)	EC2
Isocarbofós	15,877	289,0 – 136,0	5	289,0 – 113,0	5
Isoxaflutol	16,073	279,0 – 252,0	15	279,0 – 189,0	15
Ciprodinil	16,206	225,0 – 224,0	20	224,0 – 208,0	10
Clordano trans	16,65	373,0 – 265,8	15	373,0 – 336,8	5
2,4-DDD	16,677	234,4 – 199,2	25	234,4 – 165,3	5
Bromofós etil	16,681	359,0 – 302,8	35	357,0 – 300,8	35
2,4-DDE	16,767	246,0 – 176,0	30	246,0 – 175,1	40
Endossulfan alfa	16,917	241,0 – 206,0	5	195,0 – 159,0	10
Clordano cis	16,939	373,0 – 265,8	15	373,0 – 336,8	5
4,4-DDE	17,366	246,0 – 176,0	30	246,0 – 175,1	40
4,4-DDD	17,437	234,4 – 199,2	25	234,4 – 165,3	5
Clorfenson	17,503	174,5 – 111,2	15	174,5 – 75,2	15
Oxifluorfem	17,661	361,0 – 317,0	5	361,0 – 300,0	15
Buprofentezina	17,667	104,0 – 77,0	5	171,6 – 57,0	15
Uniconazol-p	17,762	233,9 – 165,1	10	233,9 – 137,0	20
Fluasifope-p butil	17,798	282,0 – 238,0	15	282,0 – 91,0	5
Flusilazol	17,933	232,6 – 165,1	25	232,6 – 152,0	15
Epoxiconazol	18,035	191,6 – 157,1	5	191,6 – 138,0	15
Clorfenapir	18,045	247,0 – 227,0	15	408,0 – 59,0	10
Endrin	18,073	281,0 – 245,0	10	263,0 – 191,0	25
Carboxin	18,099	235,0 – 143,0	5	235,0 – 162,1	10
Clorbenzilato	18,174	251,0 – 139,0	5	138,0 – 111,0	15
Dicofol	18,174	251,0 – 139,0	15	253,0 – 141,0	14
Etiona	18,474	231,0 – 129,0	8	231,0 – 175,0	25
Carbofenotiona	18,477	153,0 – 96,9	30	199,0 – 143,0	5
2,4-DDT	18,484	234,4 – 199,2	25	234,4 – 165,3	5
4,4-DDT	18,968	235,0 – 165,1	25	235,0 – 199,1	15
Propiconazol	19,134	175,0 – 147,0	15	259,0 – 69,1	5
Resmetrina	19,321	171,0 – 128,2	15	171,0 – 143,0	5
Tebuconazol	19,409	250,2 – 125,1	15	250,2 – 153,1	5
Acrinatrina	19,67	181,1 – 152,1	25	181,1 – 127,1	30
Bifentrina	19,67	181,0 – 165,0	25	181,0 – 139,0	25
Hexazenona	19,709	171,3 – 71,1	15	171,3 – 85,1	15
Iprodiona	19,844	314,0 – 245,0	10	314,0 – 56,0	10
Bromopropilato	19,881	183,0 – 155,0	15	341,0 – 183,0	15
EPN	20,087	157,0 – 110,0	15	157,0 – 77,1	22
Fenazaquina	20,168	160,0 – 117,0	25	160,0 – 145,2	20
Mirex	20,634	271,6 – 236,8	35	236,6 – 118,9	25
Triticonazol	20,66	216,5 – 182,1	5	234,4 – 182,1	10
Lambda cialotrina	20,685	196,6 – 161,3	5	196,6 – 141,3	15

Analito	Tempo de retenção (min)	Transição 1 (quantificação) (m/z)	EC1	Transição 2 (confirmação) (m/z)	EC2
Fenoxaprop etil	21,326	360,8 – 288,1	9	287,8 – 119,1	9
Azinfós metil	21,448	160,1 – 132,1	5	160,1 – 77,1	15
Permetrina	21,641	163,0 – 127,0	10	183,1 – 168,1	15
Coumafós	22,03	362,0 – 109,0	15	362,0 – 81,0	35
Ciflutrina	22,251	163,0 – 127,0	10	165,0 – 91,0	15
Cipermetrina	22,558	163,0 – 127,0	10	163,0 – 91,0	10
Fenbuconazol	22,635	198,0 – 129,0	0	198,0 – 102,0	32
Fenvalerato	24,295	167,0 – 125,0	5	225,0 – 119,0	15
Deltametrina	25,418	253,0 – 172,0	5	253,0 – 93,0	10
Azoxistrobina	27,114	344,0 – 329,1	15	388,0 – 360,1	5
Cinidon etil	27,925	358,0 – 330,0	15	393,0 – 358,0	5

Analito	Tempo de retenção (min)	Transição 1 (quantificação) (m/z)	EC1	Transição 2 (confirmação) (m/z)	EC2
Método de HPAs					
MCH	21,79	242,0 – 242,0	5	242,0 -239,1	40
BcFL	16,97	216,0 – 216,0	5	215,0 – 215,0	5
BaA	19,31	228,0 – 228,0	5	226,0 – 226,0	5
CHR	19,82	228,0 – 228,0	5	226,0 -224,0	25
CPP	20,25	226,0 – 226,0	5	228,0 – 228,0	5
BbFA	24,54	252,0 – 252,0	5	250,0 – 250,0	5
BkFA	24,63	252,0 – 252,0	5	252,0 – 250,0	25
BjFA	24,86	252,0 – 252,0	5	250,0 – 250,0	5
BaP	26,91	252,0 – 252,0	5	250,0 – 250,0	5
IP	30,51	274,0 – 274,0	5	276,0 – 276,0	5
DBahA	32,81	278,0 – 278,0	5	276,0 – 276,0	5
BghiP	35,44	276,0 – 276,0	5	277,0 – 277,0	5
DBalP	47,83	302,0 – 302,0	5	303,0 – 303,0	5
DBaeP	52,48	302,0 – 302,0	5	303,0 – 303,0	5
DBaiP	55,69	302,0 – 302,0	5	300,0 – 300,0	5
DPahP	57,32	302,0 – 302,0	5	303,0 – 303,0	5

A fórmula molecular dos pesticidas e informações a respeito de classe química, toxicidade e adicionais relevantes, podem ser encontradas no endereço eletrônico da Pesticide Action Network (PAN, 2017). O site da ANVISA apresenta documentos denominados Monografias Autorizadas, que contém informações a respeito de

pesticidas com uso permitidos no Brasil. Além de informações sobre o composto, também contêm os limites estabelecidos para as culturas determinadas (ANVISA, 2017). Para os HPAs, as estruturas dos analitos, fórmula molecular e outras informações relevantes podem ser obtidas no endereço eletrônico do NIST Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Structure Index (NIST PAH STRUCTURE INDEX, 2017).

#### 4.2. Condições cromatográficas

O método multirresíduos para análise de pesticidas foi desenvolvido com base nas condições no método do Lanagro/MG (MET/LP/PL/011: “Metodologia de análise de resíduos de pesticidas por GC-MS/MS”). Porém, modificações na rampa de aquecimento foram necessárias, devido à inserção de pesticidas de larga utilização na produção de cana-de-açúcar, tais como: 2,4-D, ametrina, azinfós metil, azoxistrobina, carbofurano, endossulfam alfa, hexazenona, isoxaflutol, lambda cialotrina, metribuzina, simazina, tebuconazol, trifluralina, entre outros. A condição adequada e satisfatória para separação e determinação dos analitos foi descrita na Tabela 3.3 e a Figura 4.1 mostra uma sobreposição dos cromatogramas dos íons extraídos do método otimizado.

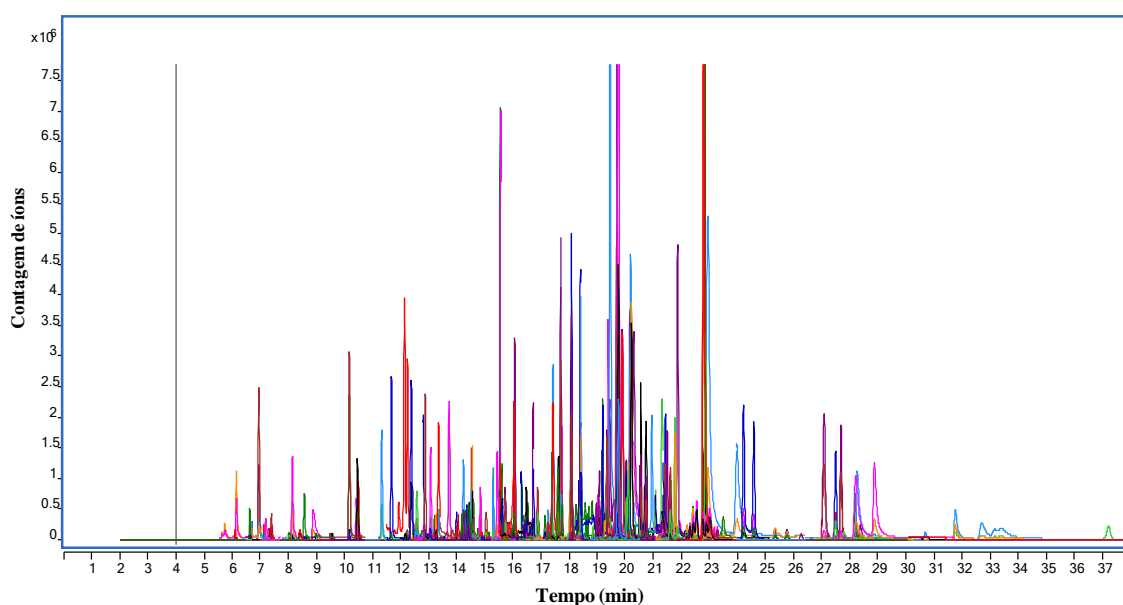


Figura 4.1: Cromatograma dos íons extraídos do método multirresíduos para análise de pesticidas em cachaça.

O método de análise dos HPAs utilizou a coluna GC J&W Agilent DB-EUPAH 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m, que é empregada em métodos de laboratórios de análise na

União Europeia. Essa coluna possibilita a separação de isômeros como BbFA, BkFA e BjFA (Figura 4.2), o que não é observado ao utilizar outras colunas disponíveis no mercado.

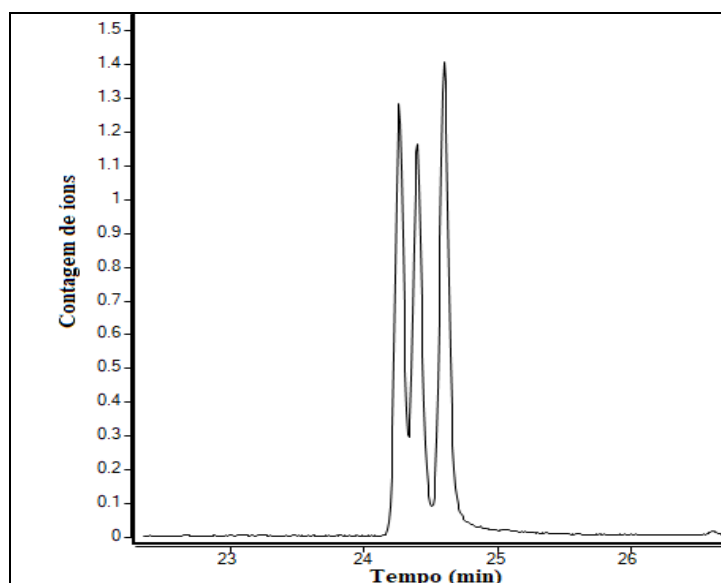


Figura 4.2: Cromatograma da análise de HPAs, no modo SRM, que mostra a separação dos isômeros BbFA, BkFA e BjFA.

As rampas do forno, de fluxo e do injetor foram otimizadas com foco na adequação ao equipamento utilizado e redução do tempo de corrida, para possibilitar a análise dos HPAs com mais de 5 anéis benzênicos, apresentam tempos de retenção mais elevados que os HPAs leves. A condição adequada e satisfatória para separação e determinação dos analitos foi descrita na Tabela 3.3 e o cromatograma dos íons extraídos do método otimizado é mostrado na Figura 4.3.

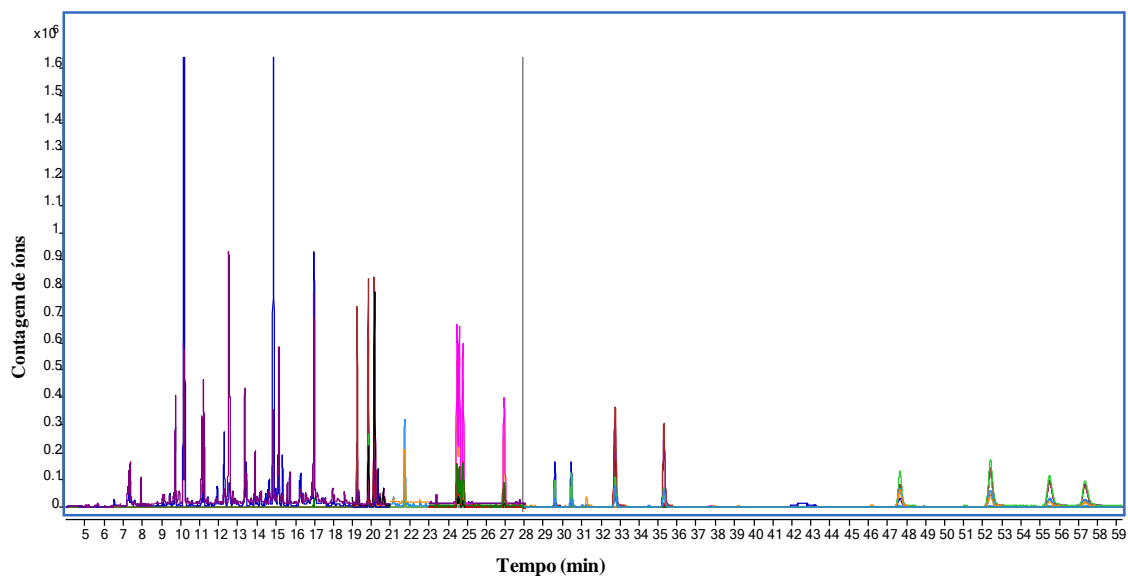


Figura 4.3: Cromatograma dos íons extraídos do método de análise de HPAs em cachaça.

#### 4.3. Otimização da extração líquido-líquido

O procedimento de extração líquido-líquido foi otimizado utilizando um planejamento fatorial  $2^2$ , o qual avaliou os fatores: evaporação da fração de etanol (fator A) e tipo de solvente de extração (fator B). A análise dos resultados obtidos no planejamento fatorial  $2^2$  foi realizada utilizando o programa Statistica. O gráfico de Pareto (Figura 4.4) e os valores dos efeitos estimados (Tabela 4.3) mostram que apenas o fator B foi estatisticamente significativo, com p-valor abaixo de 0,05. O nível +1 do fator solvente foi o que apresentou maiores áreas, considerando a média das áreas dos picos de todos os analitos. Portanto, o diclorometano foi selecionado como o solvente de extração. A maior eficiência do diclorometano como solvente extrator pode ser explicada com base em dois fatores: (1) menor polaridade, se comparado ao acetato de etila, e conseqüentemente, maior interação com os pesticidas; (2) menor solubilidade em água. Apesar dos dois solventes, diclorometano e acetato de etila, apresentarem baixas solubilidades em água, a ponto de serem considerados imiscíveis em água, a solubilidade do acetato de etila ( $83 \text{ g L}^{-1}$ ) é quatro vezes maior do que a do diclorometano ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) em água. Assim, a partição dos pesticidas da fase aquosa para a fase orgânica é favorecida em diclorometano (MERK, 2017).

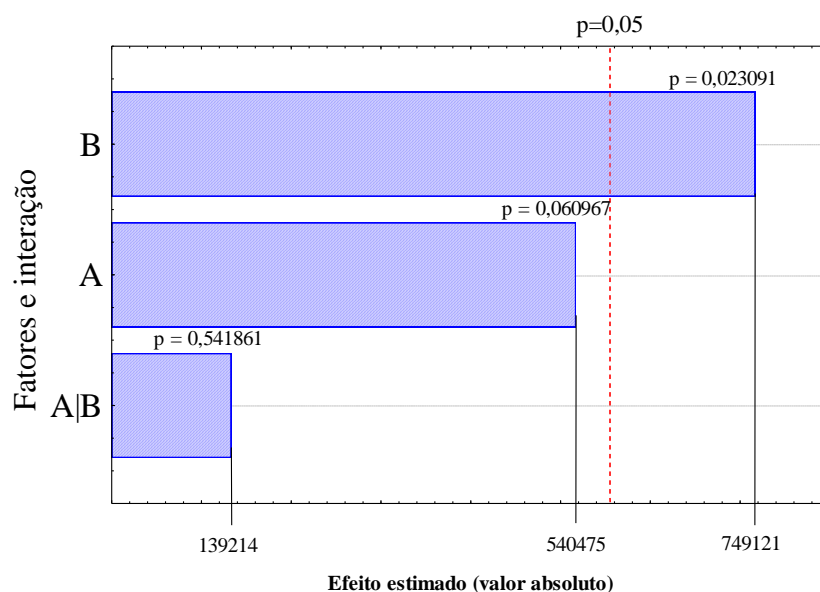


Figura 4.4: Gráfico de Pareto dos efeitos estimados no planejamento fatorial  $2^2$  realizado na otimização da extração líquido-líquido.

Tabela 4.3: Valores dos efeitos estimados obtidos no planejamento fatorial  $2^2$  realizado na otimização da extração líquido-líquido.

	Efeito	Erro puro	p-valor	Coefficiente	Erro padrão
Interseção	1438719	104516,8	0,000161	1438719	104516,8
A	-540475	209033,6	0,060967	-270238	104516,8
B	749121	209033,6	0,023091	374560	104516,8
A B	-139214	209033,6	0,541861	-69607	104516,8

O fator A e a interação entre os fatores A e B não foram estatisticamente significativos. Porém, a análise da curva de nível (Figura 4.5), mostra que o nível -1 do fator A, extração com evaporação, forneceu maiores áreas, o que reforça a hipótese de que o etanol presente na cachaça aumenta a interação dos analitos com a amostra e, conseqüentemente, dificulta a transferência para o solvente orgânico. Sendo assim, a condição com diclorometano como solvente de extração e evaporação da fração alcoólica foi adotada, uma vez que, o emprego da etapa de evaporação facilitou o alcance de níveis mais baixos de detecção.

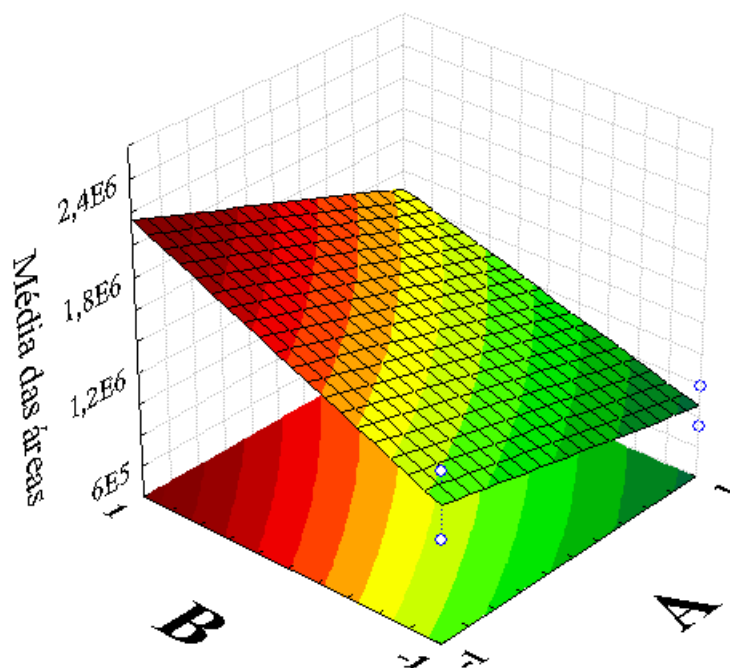


Figura 4.5: Curva de nível obtida no planejamento  $2^2$  empregado na otimização da extração líquido-líquido. Eixo A: fator evaporação e eixo B: fator solvente.

#### 4.4. Otimização da extração em fase sólida

Na otimização da extração em fase sólida utilizou-se o planejamento fatorial Box-Behnken  $3^3$ , avaliando os fatores: porcentagem de evaporação da amostra (A), volume de água na etapa de limpeza (B) e volume de diclorometano (C) (Tabela 3.5). A porcentagem de evaporação da amostra foi estudada, pois a porcentagem de etanol, considerando que a cachaça apresenta cerca de 40% de etanol em sua composição, pode influenciar na retenção dos analitos no cartucho C18, devido à interação destes com o etanol. O fator volume de água na etapa de limpeza foi estudado para avaliar se a realização de uma etapa de limpeza do cartucho levaria a obtenção de extratos mais limpos e, conseqüentemente, de cromatogramas com menos ruídos e/ou se acarretaria perda de analitos. O fator volume de diclorometano foi estudado para determinar a quantidade de solvente necessária para eluir os analitos, evitando gastos desnecessários de solvente e tempo.

A análise estatística do planejamento fatorial Box-Behnken  $3^3$  foi realizada utilizando o método dos mínimos quadrados, através do qual ajustou-se um modelo, utilizando as médias das áreas obtidas. O modelo ajustado é descrito pela Equação 4.1,

que apresenta os coeficientes do modelo e seus respectivos erros padrão. Os intervalos de 95% de confiança, traçados a partir do produto entre  $t(0,05;2) = 4,303$  e os respectivos erros padrão, mostraram que fatores e interações não foram estatisticamente significativos nos níveis avaliados, como pode ser verificado no gráfico de Pareto (Figura 4.6). Entretanto, o fator A teve uma maior influência na extração (Figura 4.6), ou seja, o aumento na porcentagem de amostra evaporada elevou a porcentagem de extração.

$$122,59(\pm 17,20) + 44,99(\pm 10,53)A + 3,15(\pm 10,53)B + 4,33(\pm 10,53)C + \quad (\text{Eq. 4.1})$$

$$12,05(\pm 15,51)A^2 - 9,98(\pm 15,51)B^2 - 0,36(\pm 15,51)C^2 + 3,46(\pm 14,90)AB +$$

$$7,86(\pm 14,90)AC - 7,49(\pm 14,90)BC$$

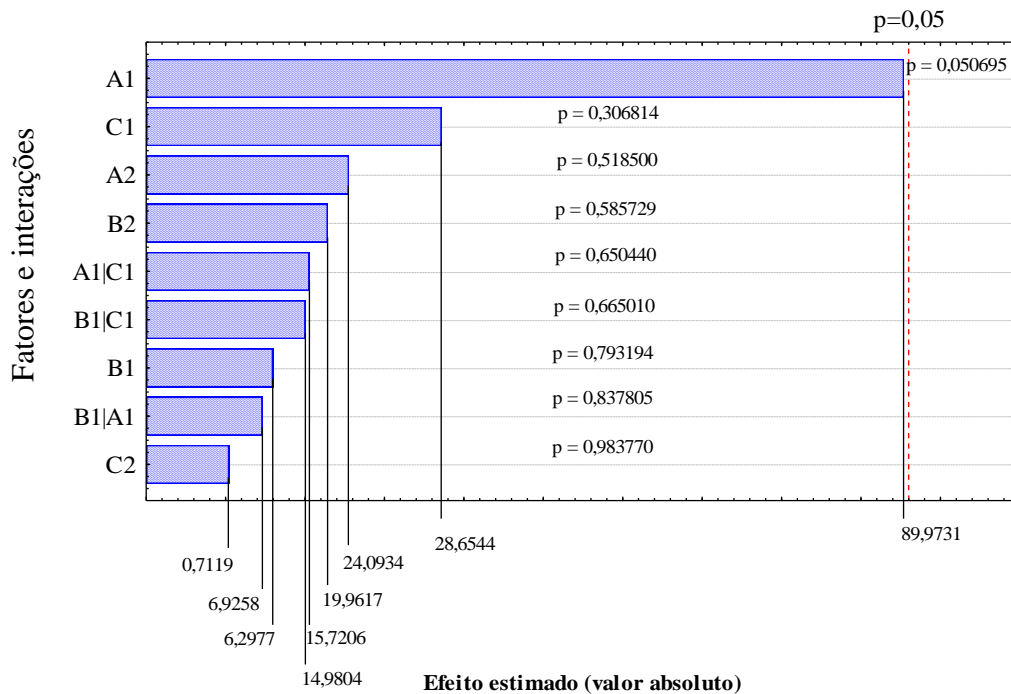


Figura 4.6: Gráfico de Pareto dos efeitos estimados no planejamento fatorial Box-Behnken  $3^3$  realizado na otimização da extração em fase sólida. A: evaporação inicial linear; B: limpeza; C: vol. de solvente; 1: linear; 2: quadrático.

Assim, a condição selecionada para a SPE foi o ponto central, devido as seguintes observações experimentais: (1) apesar do aumento da porcentagem de evaporação da amostra elevar as áreas dos pesticidas, o tempo adicional gasto para evaporar uma fração superior a 40%, ponto no qual a cachaça possui maior fração aquosa, é inviável. Para evaporar cerca de 40% do volume da amostra, gastou-se cerca de 20 minutos, ao ponto que, para evaporar 75% do volume amostra, gastou-se 1 hora. (2) A etapa de limpeza com 5 mL de água ultrapura forneceu extratos visivelmente

mais lípidos, sendo um fator importante para obtenção de maior precisão dos resultados, além de favorecer a manutenção e conservação do equipamento. (3) O volume de 15 mL de diclorometano foi selecionado a fim de manter um compromisso entre favorecer a extração, reduzir o consumo de solvente e o tempo de eluição.

#### 4.5. Otimização da extração líquido-líquido com adição de sais

A análise dos resultados adquiridos no planejamento fatorial  $2^2$ , realizado na otimização da extração líquido-líquido com adição de sais, apontou que tanto o fator A, volume de solvente de extração, quanto o fator B, tipo de solvente de extração, e a interação entre os eles foram significativos (Figura 4.7).

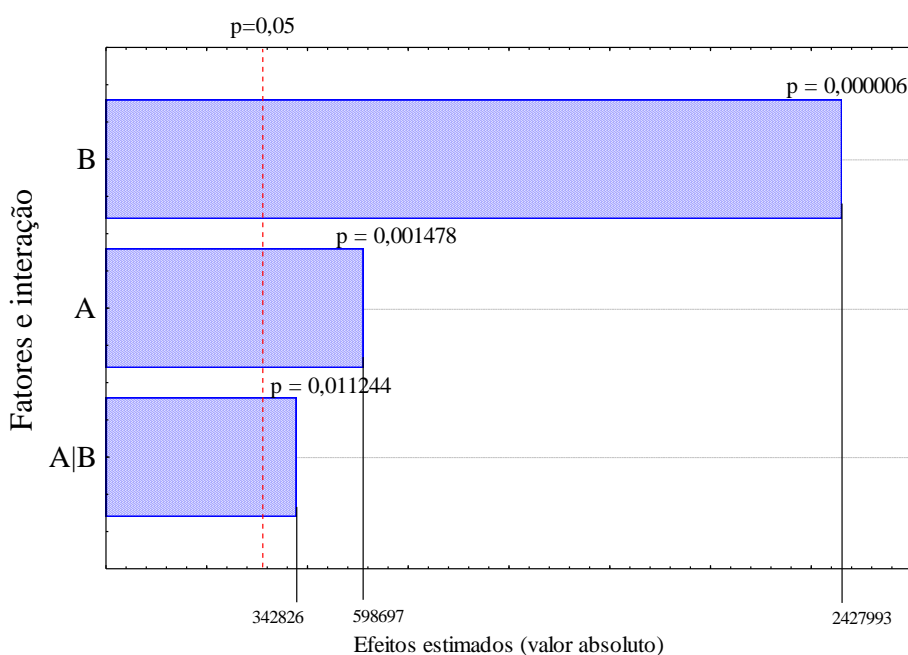


Figura 4.7: Gráfico de Pareto dos efeitos estimados no planejamento fatorial  $2^2$ , realizado na otimização da extração líquido-líquido com adição de sais.

O estudo estatístico dos dados foi realizado e os valores dos efeitos estimados, com os respectivos erros padrão, foram determinados. O p-valor para todos os efeitos ficou abaixo de 0,05, comprovando a significância estatística dos fatores estudados, bem como a interação entre eles (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Valores dos efeitos estimados obtidos no planejamento fatorial  $2^2$  realizado na otimização da extração líquido-líquido com adição de sais.

	Efeito	Erro puro	p-valor	Coefficiente	Erro padrão
Interseção	1641303	38517,16	0,000002	1641303	38517,16
A	598697	77034,32	0,001478	299349	38517,16
B	2427993	77034,32	0,000006	1213997	38517,16
A B	342826	77034,32	0,011244	171413	38517,16

A seleção da melhor condição foi realizada com base na curva de nível construída para o planejamento fatorial  $2^2$  (Figura 4.8) e no estudo da influência de cada fator individualmente. O fator volume de solvente de extração foi avaliado através da razão, em porcentagem, das médias das áreas das extrações utilizando 20 mL de solvente pelas médias das áreas das extrações utilizando 10 mL, para o mesmo solvente. A avaliação do fator tipo de solvente de extração foi realizada pela razão, em porcentagem, das médias das áreas das extrações utilizando diclorometano pelas médias das áreas utilizando acetonitrila, para o mesmo volume de solvente de extração. A curva de nível (Figura 4.8) mostra que o nível +1, para os dois fatores, foi o que forneceu os melhores resultados, ou seja, volume de solvente de extração de 20 mL e diclorometano como solvente de extração.

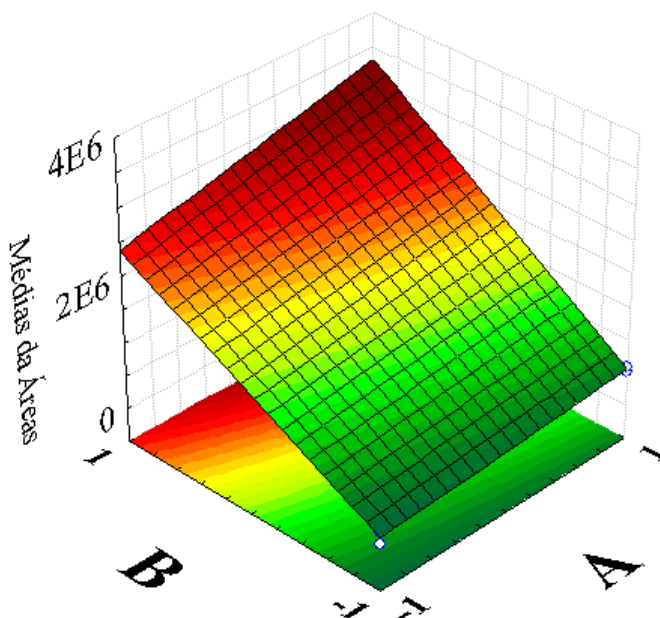


Figura 4.8: Curva de nível obtida para o planejamento  $2^2$  na otimização da extração líquido-líquido com adição de sais. Eixo A: fator volume de solvente de extração e eixo B: fator tipo de solvente.

A avaliação dos fatores, individualmente, se mostra coerente com a curva de nível obtida no estudo estatístico do planejamento. Para o fator volume de solvente de extração, as extrações com 20 mL apresentaram áreas proporcionalmente maiores para a maioria dos analitos, para os dois solventes avaliados (Figura 4.9). Na análise do fator tipo de solvente de extração, as extrações com diclorometano proporcionaram áreas 500% maiores do que as extrações com acetonitrila, para mais de 70% dos analitos, nos dois níveis de volume de solvente avaliados (Figura 4.10). Esses resultados ressaltam a eficiência do diclorometano como solvente de extração dos analitos em estudo, uma vez que, na otimização da extração líquido-líquido, este também apresentou resultados superiores em relação ao acetato de etila.

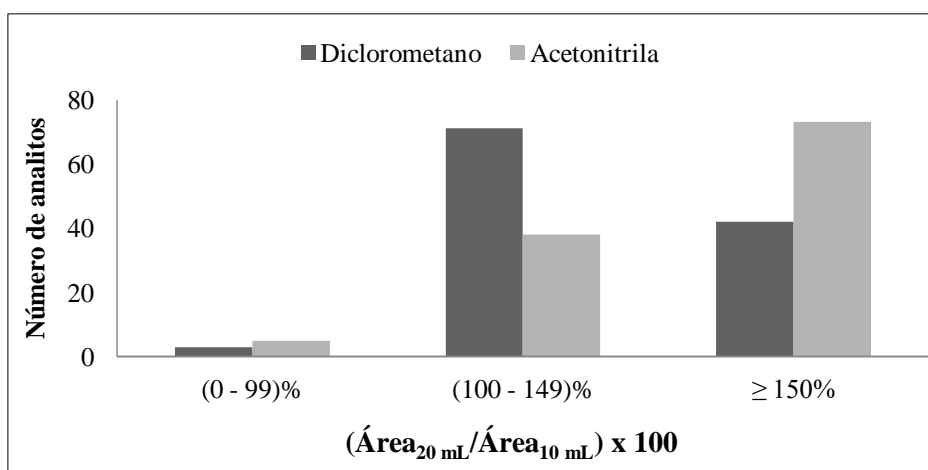


Figura 4.9: Razão de área, em porcentagem, das extrações utilizando 20 mL de solvente pelas extrações utilizando 10 mL de solvente, para os dois solventes.

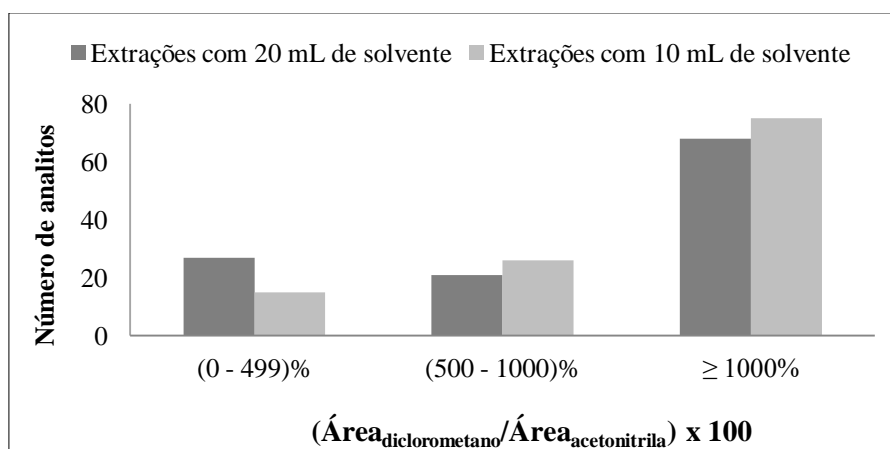


Figura 4.10: Razão de área, em porcentagem, das extrações utilizando diclorometano pelas extrações utilizando acetonitrila, nos dois volumes de solventes.

A condição ótima selecionada foi extração com 10 mL de diclorometano. Apesar das extrações utilizando 20 mL de solvente ter apresentados resultados superiores às extrações utilizando 10 mL, o fator tipo de solvente de extração mostrou uma influência, consideravelmente, maior. Na curva de nível (Figura 4.8), o eixo do fator B, apresentou uma inclinação visivelmente mais acentuada do que a inclinação do eixo do fator A e na comparação individual dos fatores, os resultados da comparação entre as extrações com diferentes solventes estava em uma escala de 0 – 1000%, enquanto na comparação entre as extrações com diferentes volumes de solvente estava em uma escala de 0 – 150%. A seleção do diclorometano como solvente de extração proporciona resultados expressivos e satisfatórios, mesmo com o uso de 10 mL de solvente, não havendo necessidade do uso de maior quantidade de solvente.

#### *4.6. Comparação dos procedimentos de extração otimizados*

Os procedimentos de extração otimizados foram comparados pela avaliação dos resultados obtidos submetendo, cada procedimento, ao preparo de uma curva de calibração e de amostras fortificadas, em triplicata, nos níveis 0,001, 0,005, 0,010 e 0,025 mg L<sup>-1</sup> dos pesticidas. Através das respostas de áreas dos picos, foram calculadas as R e o CV, para cada analito, nos três procedimentos. Os critérios fixados de aceitabilidade foram: recuperação na faixa de 70 – 120% e CV menor que 20%. Em cada nível, os analitos foram avaliados e contabilizados (Figura 4.11).

Nos três primeiros níveis de fortificação, uma quantidade pequena de analitos, para os três procedimentos, atendeu aos critérios de aceitabilidade. Porém, observou-se que, no nível superior de concentração, os resultados fornecidos pela extração líquido-líquido com adição de sais foram muito superiores aos demais procedimentos, 65 analitos (cerca de 60%) atenderam o critério de aceitabilidade. Portanto, o procedimento de extração líquido-líquido com adição de sais foi avaliado como o mais eficiente para a extração de pesticidas em cachaça e, considerando a melhora da eficiência do procedimento com o aumento do nível de fortificação, fixou-se a concentração de 0,025 mg L<sup>-1</sup> como nível mínimo de análise dos pesticidas.

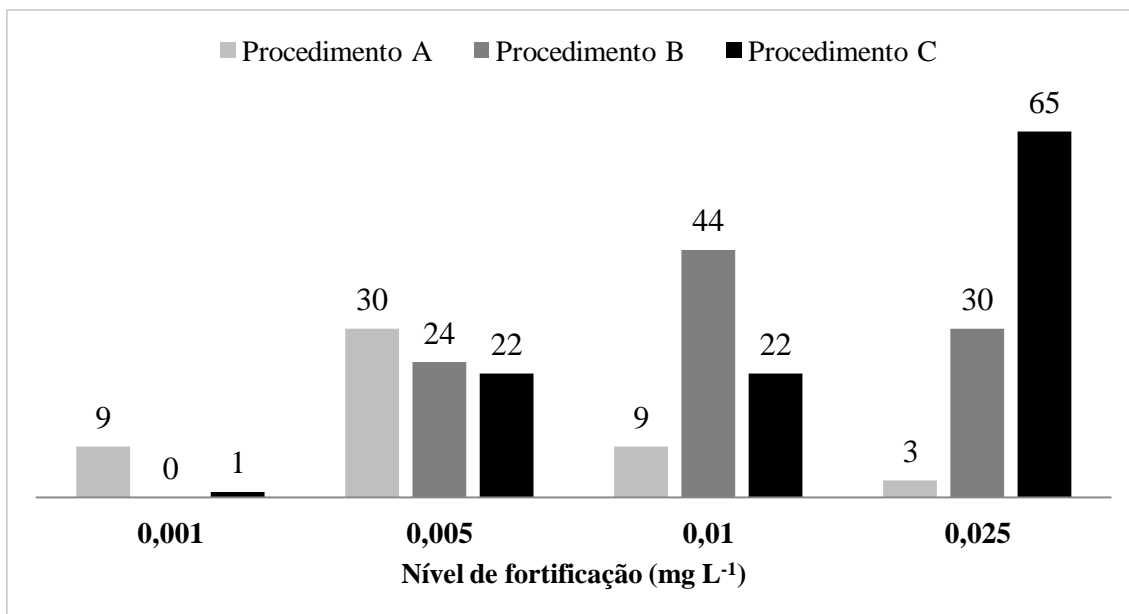


Figura 4.11: Número de analitos, em cada nível de fortificação, que satisfizeram os critérios de recuperação entre 70 -120% e coeficiente de variação menor que 20%. Total de analitos avaliados: 108. Procedimento A: extração líquido-líquido; procedimento B: extração em fase sólida; procedimento C: extração líquido-líquido com adição de sais.

#### 4.7. Expansão do procedimento de extração líquido-líquido com adição de sais para determinação dos HPAs

O procedimento de extração líquido-líquido com adição de sais foi avaliado quanto sua eficiência e adequação para análise dos HPAs. Para cada analito, preparou-se uma curva de calibração nos níveis 0,001, 0,0025, 0,005, 0,0075 e 0,01 mg L<sup>-1</sup> e amostras fortificadas no nível 0,001mg L<sup>-1</sup>, ambos em sextuplicata. Avaliou-se a R e CV, utilizando as áreas dos picos obtidos para a realização dos cálculos (Tabela 4.5). Os critérios de aceitabilidade fixados foram baseados no Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA, o qual recomenda recuperações numa faixa de 70 – 120% e CV ≤ 30% para a faixa de concentração de 0,001 – 0,010 mg L<sup>-1</sup> (BRASIL, 2011).

Tabela 4.5: Valores de R e CV dos HPAs, obtidos no ensaio para expansão do procedimento de extração líquido-líquido com adição de sais para HPAs. As amostras foram fortificadas com 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cada HPA.

		HPAs							
Parâmetros	BcFL	BaA	CHR	CPP	MCH	BbFA	BkFA	BjFA	
R (%)	93,81	88,24	95,79	95,62	105,79	105,8	100,26	109,95	
CV (%)	19,2	8,3	4,3	15,4	16,4	25	8,2	22,7	
Parâmetros	BaP	IP	DBahA	BghiP	DBalP	BBaeP	DBaiP	DBahP	
R (%)	97,69	75,93	90,01	102,23	98,81	97,15	82,35	109,24	
CV (%)	3	4,2	4,1	4,6	5,7	3,1	11,6	2	

Todos os HPAs apresentaram resultados satisfatórios no nível de concentração avaliado, com recuperações na faixa de 75,93 – 109,95% e CV ≤ 25%. O procedimento de extração líquido-líquido com adição de sais mostrou ser adequado para extração de HPAs, em cachaça. A concentração de 0,001 mg L<sup>-1</sup> foi fixada como o primeiro nível da curva para os HPAs.

#### 4.8. Validação dos métodos empregando extração líquido-líquido com adição de sais

Os métodos desenvolvidos para pesticidas e HPAs foram validados, avaliando os parâmetros de desempenho: linearidade, veracidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), LD, LQ e incerteza de medição.

O parâmetro seletividade foi avaliado e certificado durante o processo de otimização dos métodos, para garantir que fosse cumprido o critério recomendado, no qual o sinal do interferente deve ser menor ou igual a 30% do sinal no menor nível de concentração da curva de calibração. Por se tratar de métodos multirresíduos, na grande maioria dos casos, há sempre presença de efeito matriz para algum número de analitos, sendo assim, assumiu-se a presença do efeito de matriz e utilizou-se curvas matrizada.

O tratamento de dados da validação foi realizado utilizando a planilha de validação do laboratório de pesticidas do LANAGRO/MG.

#### 4.8.1. Linearidade

Inicialmente, avaliou-se a homogeneidade das variâncias das áreas através do teste F de Fisher. Para todos os analitos em estudo, o valor de F calculado através da maior variância entre os 5 níveis de concentração estudados pela menor variância entre os mesmos, foi maior que o valor tabelado ( $F_{\text{crítico}(0,05, 4, 4)} = 6,39$ ). Portanto, as variâncias foram heterocedásticas e as regressões foram realizadas pelo método dos mínimos quadrados ponderado (MMQP), utilizando o inverso das variâncias ou o inverso das concentrações, de cada nível de concentração, como ponderador (BRASIL, 2011).

As respostas consideradas *outliers* foram removidas, levando em consideração a exclusão máxima de 22,2% dos dados em cada nível e no total de pontos (HORWITZ, W., 1995; AOAC, 2002).

A adequação dos valores de  $R^2$  foi verificada através do teste *t*. A linearidade da curva pode ser considerada aceitável e  $R^2$  adequado, se o valor de  $t_{\text{calculado}}$  for maior que o  $t_{\text{crítico}}$  (BRASIL, 2011). Para todos os analitos em estudo, os valores de  $t_{\text{calculado}}$  foram superiores ao  $t_{\text{crítico}}$ , ou seja,  $R^2$  adequados (Tabela 4.6).

A linearidade das curvas de calibração também foi avaliada através da ANOVA, sendo os valores de  $F_{\text{calculado}}$  estimados para falta de ajuste ( $F_{\text{faj}}$ ) e para significância da regressão ( $F_{\text{sig}}$ ) (Tabela 4.6). O ajuste linear da regressão é considerado adequado, se o valor de  $F_{\text{faj}}$  inferior ao valor tabelado. A regressão é considerada significativa, se o valor de  $F_{\text{sig}}$  for, no mínimo, dez vezes maior que o valor tabelado. O valor de  $F_{\text{faj}}$ , ao nível de confiança de 95%, é  $F_{(0,05;3;26)} = 2,98$  e, o valor de  $F_{\text{sig}}$  é  $F_{(0,05;1;28)} = 4,1960$ , considerando as sextuplicatas, nos 5 níveis de concentração. A regressão foi considerada significativa para todos os analitos, com  $F_{\text{sig}}$  na ordem de média de 100 vezes maiores que F tabelado. Os analitos: 2,D, 4,4-DDD, bentazona, carbofurano, dicloran, diclorvós, espiroxamina, flusilazol, HCH gama, isocarbofós, isodrin, metamidofós, , oxifluorfem e paration etil, apresentaram falta de ajuste, ao nível de 95% de confiança, em algum dia de validação. Mas como os demais parâmetros de linearidade avaliados foram satisfeitos, a linearidade do método para esses analitos foi considerada aceitável.

Para os HPAs, tanto a regressão quanto o ajuste do modelo foram significativos para todos os analitos, nos três dias de validação. Sendo  $F_{faj}$ , em todos os casos, menor que 2,93 e  $F_{sig}$  muito acima do limite para falta de significância.

Tabela 4.6: Valores de  $R^2$ ,  $t_{calculado}$  para o coeficiente de correlação,  $F_{faj}$  e  $F_{sig}$ , para os três dias de validação.

Análitos	1º dia			2º dia			3º dia					
	$R^2$	$t_{calculado}$	$F_{faj}$	$F_{sig}$	$R^2$	$t_{calculado}$	$F_{faj}$	$F_{sig}$	$R^2$	$t_{calculado}$	$F_{faj}$	$F_{sig}$
<b>PESTICIDAS</b>												
2,4-D	0,98	34,09	3,38	1161,81	0,98	34,04	3,38	1161,81	0,94	20,23	2,60	409,31
2,4-DDD	0,90	14,67	1,10	215,75	0,92	16,15	2,25	260,80	0,98	34,66	2,09	1201,09
2,4-DDE	0,96	26,67	0,61	710,99	0,91	15,32	2,65	234,96	0,97	2975	0,30	885,14
2,4-DDT	0,99	40,93	0,41	1675,01	0,71	7,40	0,38	54,82	0,98	39,83	0,45	1586,64
4,4-DDD	0,96	23,51	1,80	552,64	0,97	25,09	4,79	629,56	0,95	20,78	1,18	431,75
4,4-DDE	0,97	28,35	0,74	803,99	0,82	10,16	0,31	103,27	0,98	37,19	0,40	1383,17
4,4-DDT	0,85	11,26	3,05	126,76	0,87	12,18	0,38	148,38	0,96	22,13	2,95	489,67
Acrinatrina	0,98	35,68	1,60	1272,80	0,93	16,58	2,14	274,98	0,99	49,98	1,03	2498,28
Alacloro	0,97	29,59	1,66	875,35	0,93	17,09	2,45	292,04	0,99	47,25	0,25	2232,64
Aldrin	0,97	26,26	0,47	689,52	0,90	14,59	0,84	212,81	0,96	24,62	0,03	606,24
Ametrina	0,99	49,69	0,93	2469,44	0,91	14,60	0,16	213,14	0,99	43,49	1,10	1890,96
Azinfós metil	0,91	15,45	0,55	238,79	0,91	15,21	0,89	231,49	0,94	19,08	2,79	363,88
Azoxistrobina	0,96	24,87	2,12	618,46	0,95	20,59	1,14	423,76	0,99	44,24	0,55	1958,36
Benfluralina	0,94	19,47	1,25	378,97	0,91	15,37	0,47	236,12	0,96	23,35	1,25	545,06
Bentazona	0,75	8,20	0,21	67,28	0,89	13,36	1,30	178,52	0,97	25,59	8,42	654,60
Bifentrina	0,97	25,38	0,91	644,10	0,98	34,75	1,55	1207,39	0,98	34,41	0,89	1183,74

Análitos	1° día			2° día			3° día					
	R <sup>2</sup>	t <sub>calculado</sub>	F <sub>faj</sub>	F <sub>sig</sub>	R <sup>2</sup>	t <sub>calculado</sub>	F <sub>faj</sub>	F <sub>sig</sub>	R <sup>2</sup>	t <sub>calculado</sub>	F <sub>faj</sub>	F <sub>sig</sub>
	PESTICIDAS											
Bromofós etil	0,97	26,44	1,30	699,29	0,91	15,27	1,81	233,28	0,99	43,48	0,81	1890,10
Bromofós metil	0,92	16,35	0,12	267,19	0,95	19,45	2,52	378,39	0,98	31,56	0,60	996,23
Bromopropilato	0,96	23,57	2,47	555,52	0,99	48,74	1,36	2375,97	0,97	27,31	1,43	745,64
Buprofenazina	0,98	38,95	0,45	1517,48	0,99	43,58	1,71	1899,10	0,99	52,11	2,58	2715,29
Carbofenotona	0,98	37,86	1,48	1433,04	0,78	9,55	0,26	91,26	0,98	37,41	2,16	1399,36
Carbofurano	0,97	27,82	1,46	773,85	0,94	18,41	4,22	339,09	0,99	44,47	2,50	1977,70
Carboxin	0,97	29,99	2,29	899,59	0,91	14,63	0,84	214,17	0,98	42,72	1,49	1824,61
Ciflutrina	0,96	25,63	0,37	657,00	0,90	14,16	1,56	200,54	0,99	47,33	2,33	2240,52
Cinidon etil	0,95	20,88	0,04	436,18	0,83	10,40	0,20	108,17	0,98	39,65	0,89	1571,75
Cipermetrina	0,96	24,59	0,32	604,83	0,95	20,53	1,90	421,43	0,99	49,42	1,29	2442,15
Ciprodinil	0,98	37,67	1,33	1419,12	0,93	17,15	2,55	294,27	0,98	36,05	1,11	1299,80
Clorbenzilato	0,94	19,08	0,48	364,21	0,94	19,51	2,93	380,50	0,99	46,34	0,52	2147,13
Clordano cis	0,97	31,32	0,89	981,21	0,94	18,96	2,20	359,52	0,99	51,32	0,62	2633,61
Clordano trans	0,97	30,41	0,83	924,83	0,95	20,93	1,35	437,99	0,99	47,70	0,19	2275,06
Clorfenapir	0,97	31,08	0,81	966,22	0,94	17,86	2,95	318,81	0,98	42,12	0,83	1773,86
Clorfenson	0,98	34,55	0,22	1193,51	0,93	17,42	2,70	303,44	0,98	38,29	0,90	1466,18
Clorotalonil	0,95	22,14	0,94	490,10	0,92	16,23	0,98	263,44	0,96	25,09	0,12	629,69

Análitos	1° día			2° día			3° día					
	R <sup>2</sup>	t <sub>calculado</sub>	F <sub>faj</sub>	F <sub>sig</sub>	R <sup>2</sup>	t <sub>calculado</sub>	F <sub>faj</sub>	F <sub>sig</sub>	R <sup>2</sup>	t <sub>calculado</sub>	F <sub>faj</sub>	F <sub>sig</sub>
<b>PESTICIDAS</b>												
Clorpirifós	0,96	26,51	0,30	702,65	0,90	14,47	0,25	209,44	0,98	30,41	0,45	924,55
Clorpirifós metil	0,93	18,94	0,59	358,62	0,90	14,45	2,37	208,84	0,97	31,74	1,68	1007,15
Coumafós	0,94	19,21	2,35	369,04	0,94	18,46	2,49	340,69	0,97	26,42	2,32	698,23
Deltametrina	0,95	22,15	0,72	490,81	0,93	16,65	0,71	277,06	0,98	42,63	2,89	1817,36
Dicamba	0,99	44,89	2,24	2015,40	0,90	14,02	1,40	196,67	0,99	56,88	1,71	3234,84
Dicloran	0,99	38,76	6,52	1502,48	0,91	15,35	1,90	235,66	0,99	39,28	3,63	1542,80
Diclorofluanida	0,95	23,60	0,65	557,17	0,90	14,20	1,07	201,64	0,99	53,80	0,61	2894,85
Diclorvós	0,93	17,18	32,10	295,10	0,91	15,06	1,88	226,92	0,97	25,77	1,18	664,06
Dicofol	0,94	19,08	0,48	364,21	0,91	15,02	1,61	225,61	0,98	40,53	1,81	1642,30
Dissulfotona	0,95	20,06	1,24	402,52	0,93	17,51	0,89	306,68	0,95	22,44	1,27	503,67
Dissulfotona sulfona	0,92	17,17	1,16	294,83	0,89	13,68	0,85	187,13	0,94	18,78	1,58	352,65
Endossulfan alfa	0,97	29,35	0,36	861,53	0,91	15,01	0,65	225,41	0,99	52,74	0,51	2781,26
Endrin	0,91	15,78	1,43	249,03	0,90	14,67	1,59	215,22	0,99	39,93	1,83	1594,59
EPN	0,92	16,24	0,99	263,72	0,92	15,99	0,80	255,64	0,99	39,90	2,91	1592,20
Epoxiconazol	0,96	23,62	0,69	557,79	0,84	11,49	0,55	131,94	0,98	37,69	0,50	1420,20
Espiroxamina	0,99	42,16	0,68	1777,45	0,97	24,44	3,93	597,35	0,99	63,26	0,01	4001,95
Etrona	0,96	26,89	2,55	723,23	0,92	15,67	1,91	245,41	0,99	42,28	0,85	1787,67

Análitos	1° día			2° día			3° día					
	R <sup>2</sup>	t <sub>calculado</sub>	F <sub>faj</sub>	R <sup>2</sup>	t <sub>calculado</sub>	F <sub>faj</sub>	R <sup>2</sup>	t <sub>calculado</sub>	F <sub>faj</sub>			
	F <sub>sig</sub>	F <sub>sig</sub>	F <sub>sig</sub>	F <sub>sig</sub>	F <sub>sig</sub>	F <sub>sig</sub>	F <sub>sig</sub>	F <sub>sig</sub>	F <sub>sig</sub>			
<b>PESTICIDAS</b>												
Etoprofós	0,97	25,07	1,71	628,41	0,90	14,27	1,84	203,73	0,94	20,42	1,31	416,98
Etrinfós	0,93	17,54	0,83	307,61	0,90	14,28	0,95	204,04	0,98	36,20	0,14	1310,46
Fenbuconazol	0,96	23,72	0,85	562,44	0,90	14,29	0,20	204,28	0,99	42,52	0,19	1808,04
Fenazaquina	0,98	36,65	1,75	1343,24	0,90	14,79	1,48	218,85	0,97	32,46	0,87	1053,65
Fenclorfós	0,94	20,40	1,24	416,20	0,91	14,54	0,78	211,43	0,96	25,32	0,92	641,30
Fenitrotiona	0,91	15,67	1,00	245,53	0,91	15,13	0,88	229,03	0,97	27,03	1,48	730,55
Fenobucarbe	0,91	15,91	0,61	253,11	0,91	15,68	0,76	245,85	0,94	20,59	0,60	424,04
Fenoxaprop etil	0,96	25,92	1,00	671,89	0,90	14,35	1,03	205,89	0,99	45,51	0,52	2071,36
Fenvalerato	0,96	25,47	2,45	648,55	0,95	22,16	0,97	490,91	0,98	35,72	1,50	1275,80
Fluasifope-p butil	0,97	31,20	0,41	973,26	0,94	19,22	1,42	369,53	0,99	50,46	1,73	2546,40
Flusilazol	0,97	30,79	0,62	948,32	0,97	25,52	12,81	651,05	0,99	50,67	0,94	2567,51
HCH beta	0,95	21,23	0,31	450,82	0,92	15,52	0,89	240,80	0,96	25,39	0,01	644,80
HCH gama	0,97	32,92	2,41	1083,76	0,96	21,64	4,78	468,39	0,99	48,63	0,81	2364,79
Heptacloro	0,94	20,26	0,65	410,63	0,96	24,32	1,31	591,49	0,96	26,62	2,90	708,54
Hexazenona	0,96	24,43	0,70	596,63	0,94	20,72	1,28	429,26	0,98	37,86	0,74	1433,20
Iprobenfós	0,95	21,48	2,79	461,34	0,94	18,63	0,82	346,92	0,98	33,22	3,93	1103,42
Iprodiona	0,91	15,01	1,63	225,28	0,98	29,92	1,41	895,36	0,99	43,95	1,93	1931,83

Analitos	1° día			2° día			3° día					
	R <sup>2</sup>	t <sub>calculado</sub>	F <sub>faj</sub>	F <sub>sig</sub>	R <sup>2</sup>	t <sub>calculado</sub>	F <sub>faj</sub>	F <sub>sig</sub>	R <sup>2</sup>	t <sub>calculado</sub>	F <sub>faj</sub>	F <sub>sig</sub>
PESTICIDAS												
Isocarbofós	0,93	16,76	1,88	280,81	0,95	21,12	1,26	445,93	0,99	38,84	6,53	1508,41
Isodrin	0,96	24,27	0,37	588,94	0,89	13,50	4,11	182,28	0,99	44,01	0,44	1936,69
Isoxaflutol	0,96	26,26	1,55	689,73	0,98	39,52	1,41	1561,67	0,99	43,01	2,33	1849,52
Lambda cialotrina	0,95	22,07	1,36	486,93	0,84	10,93	0,49	119,54	0,98	42,63	0,69	1817,23
Mervinfós	0,91	15,01	0,45	225,20	0,91	15,19	0,30	230,77	0,91	14,76	0,24	217,75
Metamidofós	0,93	17,48	6,28	305,63	0,87	12,01	2,12	144,35	0,69	7,63	1,19	58,25
Metribuzina	0,97	29,75	1,95	885,26	0,93	18,13	2,96	328,62	0,99	52,34	3,01	2739,68
Mirex	0,97	27,94	2,21	780,75	0,92	17,27	0,77	298,13	0,97	28,76	0,25	827,19
Oxifluorfem	0,97	25,64	2,78	657,57	0,90	15,05	0,17	226,36	0,99	49,37	8,19	2437,37
Paration etil	0,93	19,32	2,48	373,41	0,88	12,72	0,78	161,79	0,99	41,74	4,86	1742,53
Permetrina	0,92	17,65	1,47	311,37	0,95	24,17	1,00	584,15	0,99	51,83	0,28	2686,21
Pirimicarbe	0,98	33,11	1,81	1096,20	0,94	19,30	2,89	372,46	0,98	31,85	1,01	1014,56
Pirimifós etil	0,95	19,54	2,89	381,75	0,94	20,18	1,83	407,03	0,97	29,61	1,32	876,53
Pirimifós metil	0,97	30,67	2,97	940,89	0,95	21,87	2,42	478,08	0,97	26,88	0,98	722,36
Promecarbe	0,97	28,71	1,89	824,52	0,89	14,09	1,94	198,59	0,96	22,38	1,07	500,69
Prometryn	0,99	46,67	1,00	2177,68	0,93	18,62	1,58	346,86	0,97	27,94	0,90	780,54
Propiconazol	0,98	35,50	0,93	1259,94	0,91	15,18	1,56	230,34	0,96	22,64	1,49	512,68

Análitos	1° día			2° día			3° día					
	R <sup>2</sup>	t <sub>calculado</sub>	F <sub>faj</sub>	F <sub>sig</sub>	R <sup>2</sup>	t <sub>calculado</sub>	F <sub>faj</sub>	F <sub>sig</sub>	R <sup>2</sup>	t <sub>calculado</sub>	F <sub>faj</sub>	F <sub>sig</sub>
<b>PESTICIDAS</b>												
Quintozeno	0,96	23,66	1,19	559,64	0,86	11,74	0,48	137,79	0,94	19,30	2,47	372,44
Resmetrina	0,93	17,26	2,90	298,04	0,94	19,26	1,26	370,87	0,99	41,32	2,13	1707,16
Simazina	0,93	17,30	2,75	299,36	0,93	17,48	0,85	305,64	0,97	29,44	0,60	866,70
Tebuconazol	0,96	23,11	1,84	534,23	0,92	15,91	1,74	253,17	0,91	16,09	0,39	258,93
Tetraconazol	0,97	28,82	2,32	830,71	0,90	13,91	2,33	193,50	0,96	24,00	2,28	576,02
Tiobencarbe	0,93	19,62	1,44	384,75	0,92	15,48	2,67	239,72	0,94	19,93	0,96	397,07
Tolclofós metil	0,95	23,47	2,41	550,81	0,94	18,70	1,66	349,68	0,96	24,91	1,59	620,38
Trifluralina	0,96	22,10	1,35	488,27	0,95	20,38	0,56	415,49	0,92	15,80	0,47	249,77
Triticonazol	0,97	26,58	1,78	706,59	0,92	16,04	2,43	257,17	0,91	15,56	0,72	242,21
Uniconazol	0,96	22,98	0,42	527,87	0,98	36,43	0,26	1326,79	0,94	18,32	0,92	335,61
Vinclosolina	0,98	35,07	2,45	1230,17	0,94	19,26	0,95	370,77	0,98	34,49	1,50	1189,36
<b>HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS</b>												
MCH	0,99	58,84	2,04	3462,20	0,93	18,40	1,28	338,40	0,95	20,49	0,77	419,99
BaA	0,99	42,24	1,74	1784,44	0,94	20,51	0,56	420,75	0,98	33,13	2,57	1097,63
BbFA	0,98	31,72	1,05	1006,07	0,95	20,12	2,31	404,84	0,95	21,54	0,73	463,86
BjFA	0,98	36,32	0,28	1318,82	0,92	16,92	1,22	286,26	0,97	25,77	2,70	663,91
BkFA	0,87	12,35	0,22	152,45	0,93	19,30	0,37	372,39	0,97	25,96	2,30	674,06

Analitos	1° día					2° día					3° día					
	R <sup>2</sup>	t <sub>calculado</sub>	F <sub>faj</sub>	F <sub>sig</sub>	R <sup>2</sup>	t <sub>calculado</sub>	F <sub>faj</sub>	F <sub>sig</sub>	R <sup>2</sup>	t <sub>calculado</sub>	F <sub>faj</sub>	F <sub>sig</sub>	R <sup>2</sup>	t <sub>calculado</sub>	F <sub>faj</sub>	F <sub>sig</sub>
	<b>HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS</b>															
BaP	0,96	24,59	2,32	604,49	0,94	20,24	0,87	409,83	0,96	23,28	1,29	542,08	0,96	23,28	1,29	542,08
BghiP	0,93	17,95	1,21	322,19	0,94	19,84	1,32	393,66	0,96	24,59	2,56	604,55	0,96	24,59	2,56	604,55
CHR	0,94	18,21	0,22	331,69	0,93	19,03	0,16	362,27	0,97	26,96	0,72	726,84	0,97	26,96	0,72	726,84
CPP	0,92	15,46	0,82	239,05	0,99	43,18	1,00	1864,27	0,98	38,04	2,21	1447,40	0,98	38,04	2,21	1447,40
DBahA	0,93	17,43	0,88	303,86	0,96	24,84	1,53	616,93	0,94	19,72	2,64	388,77	0,94	19,72	2,64	388,77
DBaeP	0,94	18,66	2,03	348,04	0,98	34,40	2,47	1183,14	0,97	27,45	2,66	753,77	0,97	27,45	2,66	753,77
DBahP	0,92	17,41	0,87	303,27	0,99	42,76	2,93	1828,22	0,97	32,14	1,74	1032,94	0,97	32,14	1,74	1032,94
DBaiP	0,97	28,02	2,67	785,12	0,97	31,57	2,21	996,55	0,97	27,48	2,30	755,09	0,97	27,48	2,30	755,09
DBalP	0,91	14,66	2,90	214,95	0,98	34,16	1,21	1166,85	0,93	18,34	0,48	336,27	0,93	18,34	0,48	336,27
IP	0,92	18,17	2,56	330,04	0,96	26,53	2,87	703,80	0,97	26,83	1,50	719,84	0,97	26,83	1,50	719,84
BcFL	0,94	18,52	0,14	342,84	0,91	15,83	0,23	250,46	0,97	29,76	0,95	885,75	0,97	29,76	0,95	885,75

#### 4.8.2. Veracidade e precisão

A veracidade de cada método foi avaliada através dos valores R, obtidos para as amostras fortificadas, em sextuplicata, em três níveis de concentração (item 3.13.2.). Segundo o Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA, o método deve apresentar capacidade de recuperar, de 70 – 120% em média, para os analitos, em cada nível fortificado (BRASIL, 2011). Para todos os analitos foram obtidas recuperações dentro da faixa recomendada, pesticidas (Tabela 4.7) e HPAs (Tabela 4.8).

A precisão foi avaliada através da determinação do CV nos níveis de repetibilidade e de precisão intermediária. O critério de aceitabilidade determina que o valor não ultrapasse 20% para análises na faixa de concentração de 0,01 – 0,10 mg L<sup>-1</sup>, faixa de trabalho dos pesticidas e, não ultrapasse 30% para análises na faixa de concentração de 0,001 – 0,010 mg L<sup>-1</sup>, faixa de trabalho dos HPAs (BRASIL, 2011). A repetibilidade foi avaliada pelo CV das recuperações estimadas, nos três níveis de fortificação, em cada dia de validação, para os pesticidas e para os HPAs. E, a precisão intermediária, pelo CV das recuperações globais estimadas para os três dias de validação, em cada nível, para os pesticidas (Tabela 4.7) e para os HPAs (Tabela 4.8).

Na avaliação dos pesticidas, alguns analitos apresentaram CV acima de 20% em algum nível de fortificação. Porém, como o procedimento sugerido pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA, para análise da precisão, recomenda a fortificação em apenas dois níveis, considerou-se válidos os resultados que apresentavam CV abaixo de 20% para pelo menos dois níveis de fortificação (BRASIL, 2011). Apenas para lambda cialotrina (CV (0,01 mg L<sup>-1</sup>) = 30,47%, CV (0,05 mg L<sup>-1</sup>) = 11,40% e CV (0,10 mg L<sup>-1</sup>) = 28,36%) e metamidofós (CV (0,01 mg L<sup>-1</sup>) = 26,66%, CV (0,05 mg L<sup>-1</sup>) = 17,28% e CV (0,10 mg L<sup>-1</sup>) = 27,37%) os resultados de precisão não atenderam os critérios de aceitabilidade.

Na faixa de trabalho, em que os HPAs foram quantificados, 0,001 – 0,01 mg L<sup>-1</sup>, a recomendação para é de CV ≤ 30%. Todos os HPAs apresentaram CV abaixo do limite estabelecido, mostrando que o método é preciso, com a maioria dos CVs abaixo de 20% (limite para faixa de concentração superior, 0,01 – 0,1 mg L<sup>-1</sup>). Apenas cinco analitos, em algum nível de fortificação, apresentaram CV acima de 20%, não ultrapassando o valor de 27,33%.

Tabela 4.7: Valores de R média, considerando os três dias de validação e, valores de CV para precisão intermediária, para os pesticidas.

Pesticida	0,01 (mg L <sup>-1</sup> )		0,05 (mg L <sup>-1</sup> )		0,10 (mg L <sup>-1</sup> )	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
2,4-D	88,57	14,95	98,22	14,44	93,16	10,34
2,4-DDD	103,94	15,74	102,85	16,16	90,69	18,39
2,4-DDE	94,12	20,15	100,89	10,62	98,91	12,53
2,4-DDT	93,44	19,13	97,52	9,71	96,20	10,00
4,4-DDD	106,95	16,21	102,10	11,82	101,13	13,35
4,4-DDE	102,54	16,46	95,44	9,29	93,71	10,17
4,4-DDT	100,13	15,55	103,80	18,64	104,11	22,02
Acrinatrina	95,52	14,21	98,69	10,68	97,28	10,15
Alacloro	95,44	14,27	101,42	9,67	98,60	7,02
Aldrin	98,97	19,14	97,64	12,40	98,73	10,92
Ametrina	99,75	11,76	100,06	6,58	95,42	8,00
Azinfós metil	114,84	13,79	97,42	17,27	103,65	14,81
Azoxistrobina	104,58	12,24	102,25	8,88	95,44	12,34
Benfluralina	105,39	10,28	93,31	15,17	96,74	13,08
Bentazona	112,02	8,64	101,79	14,52	98,12	25,56
Bifentrina	101,71	11,13	106,00	19,48	97,81	7,92
Bromofós etil	103,27	19,98	99,02	16,42	94,44	14,79
Bromofós metil	98,49	15,39	96,66	10,22	94,70	13,98
Bromopropilato	108,59	9,89	103,39	12,50	98,51	9,64
Buprofentezina	99,84	12,40	102,85	9,47	96,96	7,08
Carbofenotiona	94,01	17,15	95,44	11,44	95,98	11,15
Carbofurano	99,74	15,57	98,07	12,04	105,94	13,96
Carboxin	118,24	18,36	99,36	10,19	98,82	9,09
Ciflutrina	100,72	14,98	98,94	11,20	98,43	12,54
Cinidon etil	100,08	13,49	98,03	11,92	92,16	14,21
Cipermetrina	102,14	15,95	95,95	9,84	96,49	12,62
Ciprodinil	88,28	9,93	100,21	12,71	103,34	10,25
Clorbenzilato	99,68	15,20	99,95	9,13	93,57	10,40
Clordano cis	102,32	16,53	103,15	8,86	98,52	7,02
Clordano trans	102,68	14,94	102,06	7,45	97,13	8,12
Clorfenapir	95,72	13,64	101,60	9,91	96,44	10,64
Clorfenson	96,43	19,91	101,86	13,28	94,99	8,61
Clorotalonil	97,74	17,74	95,95	8,53	97,34	10,88
Clorpirifós	99,32	22,57	96,86	10,00	97,54	8,84
Clorpirifós metil	100,36	15,69	93,92	13,24	94,75	15,11
Coumafós	113,25	9,29	95,98	13,76	96,30	12,53
Deltametrina	99,30	15,73	98,15	13,30	95,35	13,70
Dicamba	101,27	17,79	99,55	12,15	99,92	19,11
Dicloran	108,15	6,73	94,08	11,37	95,41	9,96

Pesticida	0,01 (mg L <sup>-1</sup> )		0,05 (mg L <sup>-1</sup> )		0,10 (mg L <sup>-1</sup> )	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
Diclorofluanida	102,16	14,63	105,01	9,34	96,25	11,19
Diclorvós	102,33	16,16	104,09	14,12	101,90	11,25
Dicofol	102,82	15,65	102,32	11,54	99,90	12,23
Dissulfotona	147,51	43,00	93,37	20,00	97,56	12,31
Dissulfotona sulfona	105,62	8,30	94,19	12,22	95,48	12,54
Endossulfan alfa	101,33	16,59	100,97	8,90	99,32	10,11
Endrin	104,10	13,49	100,94	9,96	96,60	12,81
EPN	102,95	12,02	101,27	10,68	98,48	14,11
Epoconazol	12,16	8,01	94,56	18,13	94,58	13,79
Espiroxamina	103,13	9,91	102,68	9,04	94,16	12,57
Etiona	103,91	15,24	100,26	9,08	98,77	12,29
Etoprofós	108,21	14,07	104,23	20,77	98,43	15,38
Etrinfós	106,38	15,09	98,19	11,99	94,53	10,32
Fenbuconazol	108,29	7,55	100,06	14,90	97,47	16,62
Fenazaquina	97,56	15,28	98,25	11,93	95,73	10,27
Fenclorfós	99,75	19,57	97,95	14,13	94,56	11,14
Fenitrotiona	110,24	11,88	97,57	8,60	93,32	11,14
Fenobucarbe	93,19	17,11	86,65	15,34	95,73	11,73
Fenoxaprop etil	98,71	17,57	100,79	10,94	95,58	10,85
Fenvalerato	93,82	15,82	98,20	12,11	93,07	13,60
Fluasifope-p butil	97,22	17,46	102,11	8,21	96,49	8,38
Flusilazol	104,61	11,08	102,15	7,72	94,45	11,79
HCH beta	91,39	16,06	96,78	16,66	98,92	10,63
HCH gama	95,25	13,07	100,08	6,49	98,81	7,53
Heptaclo	94,19	11,62	94,02	15,39	94,88	7,43
Hexazona	101,70	14,48	106,97	19,16	95,22	10,20
Iprobenfós	110,50	12,44	105,44	15,34	96,67	12,67
Iprodiona	106,97	14,31	93,98	17,94	94,86	16,95
Isocarbofós	111,19	15,12	93,79	18,85	95,40	14,60
Isodrin	102,02	17,74	94,70	9,29	93,77	12,68
Isoxaflutol	99,70	14,35	95,95	10,14	99,36	11,79
Lambda cialotrina	105,85	30,47	96,67	11,40	92,02	28,36
Mervinfós	110,42	14,39	96,78	18,91	90,52	17,05
Metamidofós	108,67	29,66	110,34	17,28	105,46	27,37
Metribuzina	102,17	10,94	95,69	12,31	99,57	16,47
Mirex	100,81	17,55	101,38	8,51	99,61	11,71
Oxifluorfem	104,87	12,78	97,12	14,18	97,32	16,88
Paration etil	106,16	11,49	97,55	10,52	97,67	12,45
Permetrina	94,65	15,18	100,39	10,92	90,24	15,63
Pirimicarbe	99,05	13,42	104,49	8,30	97,10	9,87
Pirimifós etil	96,36	12,01	100,63	10,40	99,85	9,95

Pesticida	0,01 (mg L <sup>-1</sup> )		0,05 (mg L <sup>-1</sup> )		0,10 (mg L <sup>-1</sup> )	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
Pirimifós metil	99,35	15,47	100,07	6,09	101,80	9,02
Promecarbe	100,05	14,46	94,86	12,98	100,43	12,57
Prometryn	99,94	15,67	105,40	6,48	98,24	10,50
Propiconazol	96,47	18,79	101,64	13,97	104,78	12,19
Quintozeno	112,55	9,52	90,09	15,74	100,03	14,21
Resmetrina	98,31	17,81	103,52	17,76	97,41	11,91
Simazina	101,80	11,84	107,38	15,33	97,66	13,98
Tebuconazol	102,33	14,26	112,71	13,69	98,08	16,99
Tetraconazol	96,52	16,65	104,17	10,27	102,76	11,87
Tiobencarbe	93,33	19,14	96,60	13,15	101,41	9,84
Tolclofós metil	100,14	17,96	98,14	8,23	102,04	9,45
Trifluralina	94,81	19,85	90,31	13,88	101,96	14,47
Triticonazol	90,60	9,43	107,67	14,56	100,51	12,78
Uniconazol	88,80	16,50	110,97	32,61	105,30	16,36
Vinclosolina	94,27	14,69	100,42	6,85	105,19	12,22

Tabela 4.8: Valores de R média, considerando os três dias de validação e, valores de CV para precisão intermediária, para os HPAs.

HPA	0,001 (mg L <sup>-1</sup> )		0,005 (mg L <sup>-1</sup> )		0,010 (mg L <sup>-1</sup> )	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
MCH	120,78	18,67	95,28	14,32	97,26	22,41
BaA	95,20	25,29	93,10	15,45	90,53	11,03
BbFA	97,69	27,33	98,63	14,67	92,68	10,11
BjFA	104,36	22,01	92,47	17,30	92,43	9,42
BkFA	110,05	19,34	95,07	16,49	90,74	11,99
BaP	87,76	18,10	9,70	15,03	87,65	11,83
BghiP	92,47	16,04	96,48	10,81	90,80	8,37
CHR	111,45	22,58	87,08	15,77	84,76	9,80
CPP	107,49	23,40	94,73	6,23	92,10	10,48
DBahA	96,41	18,87	93,88	14,76	89,38	11,72
DBaeP	95,27	17,33	97,32	14,90	91,69	17,66
DBahP	108,09	17,98	96,42	16,16	99,01	9,32
DBaiP	89,47	16,29	97,68	12,65	95,74	11,38
DBalP	102,77	12,12	96,10	13,90	95,60	11,29
IP	92,60	17,06	98,56	7,01	97,80	6,60
BcFL	99,36	17,07	96,26	11,52	95,36	10,44

#### 4.8.3. Limites de detecção e quantificação dos métodos

O LD, de cada método, foi determinado pela análise das respostas instrumentais fornecidas na injeção de amostras fortificadas em quatro concentrações: 0,001, 0,0025, 0,005 e 0,075 mg L<sup>-1</sup>, para os pesticidas e 10 vezes mais diluídas para os HPAs. O critério para determinação da LD foi que, a resposta instrumental mostrasse clara diferenciação entre os ruídos, com razão sinal/ruído maior que três e simetria similar dos picos cromatográficos. O LD do método foi definido com 0,0025 mg L<sup>-1</sup>, para os pesticidas e 0,00025 mg L<sup>-1</sup>, para os HPAs, pois nestas concentrações foi possível detectar com segurança todos os analitos.

O LQ do método, segundo o Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA, é o menor nível de concentração que atenda os critérios de veracidade e precisão, considerando também uma relação sinal ruído acima de seis (BRASIL, 2011). Neste caso, o LQ foi definido como o primeiro ponto da curva de calibração, ou seja, 0,01 mg L<sup>-1</sup> para os pesticidas e 0,001 mg L<sup>-1</sup> para os HPAs. Para os pesticidas: 2,4-DDE, clorpirifós, dissulfotona, lambda cialotrina e metamidofós, o LQ definido foi 0,05 mg L<sup>-1</sup>, pois esta foi a menor concentração que forneceu precisão adequada (Tabela 4.7).

#### 4.8.4. Incerteza de medição

A  $u_{comb}$ , que neste caso, representa a incerteza de medição, foi estimada levando em consideração duas fontes principais de incerteza:  $u_{calib}$  e  $u_{PI}$ . Para cada analito, a  $u_{comb}$  foi calculada seguindo o procedimento descrito no item 3.13.4. Os valores de  $u_{comb}$  são apresentados na Tabela 4.9 e na Tabela 4.10, para pesticidas e HPAs, respectivamente:

Tabela 4.9: Valores de  $u_{comb}$ , para os pesticidas, os níveis de concentração avaliados.

Pesticida	Nível de concentração (mg L <sup>-1</sup> )		
	0,01	0,05	0,1
2,4-D	0,0035	0,0034	0,0066
2,4-DDD	0,0035	0,0029	0,0058
2,4-DDE	0,0028	0,0032	0,0057
2,4-DDT	0,0021	0,0025	0,0071
4,4-DDD	0,0029	0,0023	0,0045

Pesticida	Nível de concentração (mg L <sup>-1</sup> )		
	0,01	0,05	0,1
4,4-DDE	0,0020	0,0025	0,0062
4,4-DDT	0,0033	0,0043	0,0127
Acrinatrina	0,0022	0,0018	0,0034
Alacloro	0,0023	0,0026	0,0047
Aldrin	0,0040	0,0036	0,0080
Ametrina	0,0014	0,0020	0,0054
Azinfós metil	0,0030	0,0027	0,0048
Azoxistrobina	0,0040	0,0036	0,0080
Benfluralina	0,0022	0,0022	0,0039
Bentazona	0,0036	0,0028	0,0072
Bifentrina	0,0021	0,0032	0,0042
Bromofós etil	0,0026	0,0025	0,0044
Bromofós metil	0,0020	0,0017	0,0040
Bromopropilato	0,0021	0,0020	0,0032
Buprofezina	0,0013	0,0014	0,0022
Carbofenotona	0,0023	0,0019	0,0036
Carbofurano	0,0040	0,0036	0,0080
Carboxin	0,0022	0,0018	0,0032
Ciflutrina	0,0040	0,0036	0,0080
Cinidon etil	0,0013	0,0016	0,0036
Cipermetrina	0,0020	0,0017	0,0037
Ciprodinil	0,0024	0,0026	0,0054
Clorbenzilato	0,0040	0,0036	0,0080
Clordano cis	0,0020	0,0016	0,0027
Clordano trans	0,0015	0,0013	0,0025
Clorfenapir	0,0023	0,0018	0,0035
Clorfenson	0,0021	0,0020	0,0030
Clorotalonil	0,0019	0,0015	0,0033
Clorpirifós	0,0014	0,0014	0,0025
Clorpirifós metil	0,0030	0,0024	0,0048
Coumafós	0,0040	0,0036	0,0080
Deltametrina	0,0020	0,0020	0,0039
Dicamba	0,0022	0,0020	0,0051
Dicloran	0,0029	0,0022	0,0040
Diclorofluanida	0,0021	0,0017	0,0035
Diclorvós	0,0051	0,0035	0,0061
Dicofol	0,0025	0,0020	0,0040
Dissulfotona	0,0028	0,0030	0,0041
Dissulfotona sulfona	0,0040	0,0036	0,0080
Endossulfan alfa	0,0015	0,0014	0,0029
Endrin	0,0031	0,0022	0,0045

Pesticida	Nível de concentração (mg L <sup>-1</sup> )		
	0,01	0,05	0,1
EPN	0,0023	0,0019	0,0042
Epoxiconazol	0,0020	0,0030	0,0039
Espiroxamina	0,0017	0,0016	0,0043
Etiona	0,0026	0,0019	0,0040
Etoprofós	0,0031	0,0031	0,0049
Etrinfós	0,0021	0,0019	0,0033
Fenbuconazol	0,0014	0,0022	0,0061
Fenazaquina	0,0024	0,0020	0,0036
Fenclorfós	0,0025	0,0022	0,0037
Fenitrotiona	0,0027	0,0019	0,0039
Fenobucarbe	0,0025	0,0024	0,0038
Fenoxaprop etil	0,0021	0,0018	0,0034
Fenvalerato	0,0022	0,0020	0,0040
Fluasifope-p butil	0,0018	0,0014	0,0027
Flusilazol	0,0023	0,0017	0,0037
HCH beta	0,0015	0,0022	0,0030
HCH gama	0,0024	0,0017	0,0032
Heptacloro	0,0023	0,0023	0,0031
Hexazenona	0,0019	0,0025	0,0031
Iprobenfós	0,0028	0,0025	0,0043
Iprodiona	0,0023	0,0025	0,0047
Isocarbofós	0,0027	0,0028	0,0045
Isodrin	0,0031	0,0027	0,0060
Isoxaflutol	0,0017	0,0016	0,0033
Lambda cialotrina	0,0022	0,0019	0,0071
Mervinfós	0,0021	0,0026	0,0046
Metamidofós	0,0040	0,0036	0,0080
Metribuzina	0,0026	0,0021	0,0048
Mirex	0,0019	0,0015	0,0034
Oxifluorfem	0,0020	0,0021	0,0046
Paration etil	0,0028	0,0027	0,0072
Permetrina	0,0020	0,0018	0,0043
Pirimicarbe	0,0025	0,0020	0,0039
Pirimifós etil	0,0029	0,0022	0,0040
Pirimifós metil	0,0026	0,0019	0,0039
Promecarbe	0,0033	0,0028	0,0052
Prometryn	0,0021	0,0017	0,0036
Propiconazol	0,0028	0,0024	0,0041
Quintozeno	0,0029	0,0026	0,0046
Resmetrina	0,0031	0,0028	0,0044
Simazina	0,0030	0,0026	0,0046

Pesticida	Nível de concentração (mg L <sup>-1</sup> )		
	0,01	0,05	0,1
Tebuconazol	0,0031	0,0025	0,0052
Tetraconazol	0,0036	0,0027	0,0055
Tiobencarbe	0,0031	0,0027	0,0056
Tolclofós metil	0,0028	0,0022	0,0043
Trifluralina	0,0023	0,0021	0,0042
Triticonazol	0,0033	0,0040	0,0088
Uniconazol	0,0017	0,0041	0,0053
Vinclosolina	0,0040	0,0036	0,0080

Tabela 4.10: Valores de  $u_{comb}$ , para os HPAs, os níveis de concentração avaliados.

HPA	Nível de concentração (mg L <sup>-1</sup> )		
	0,001	0,005	0,01
MCH	0,00021	0,00021	0,00057
BaA	0,00020	0,00022	0,00033
BbFA	0,00025	0,00023	0,00035
BjFA	0,00024	0,00025	0,00034
BkFA	0,00022	0,00023	0,00037
BaP	0,00026	0,00024	0,00040
BghiP	0,00031	0,00023	0,00039
CHR	0,00015	0,00021	0,00028
CPP	0,00021	0,00014	0,00033
DBahA	0,00030	0,00025	0,00043
DBaeP	0,00028	0,00025	0,00052
DBahP	0,00023	0,00024	0,00033
DBaiP	0,00026	0,00022	0,00039
DBalP	0,00028	0,00023	0,00040
IP	0,00026	0,00021	0,00038
BcFL	0,00015	0,00016	0,00029

A amplitude das  $u_{comb}$  estimadas foi avaliada pela comparação com o valor de incerteza máxima ( $U_{max}$ ), determinada através da Equação 4.4 (CE, 2006).

$$U_{max} = \sqrt{\left(\frac{LD}{2}\right)^2 + (\alpha C)^2} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

Onde: LD é o limite de detecção do método; C é a concentração média do analito, considerando os três dias de validação, no nível em que se deseja estimar a incerteza e  $\alpha$  é um parâmetro relacionado ao C em questão (Tabela 4.11):

Tabela 4.11: Valor do parâmetro  $\alpha$  de acordo com a concentração em estudo.

C (mg L <sup>-1</sup> )	$\alpha$
≤ 0,050	0,20
0,051 – 0,5	0,18
0,501 – 1	0,15
1,001 – 10	0,12
> 10	0,10

Realizando a comparação dos valores  $u_{comb}$  com os  $U_{max}$  (Tabela 4.12), observou-se que, para ambos, pesticidas e HPAs, apenas no primeiro nível de concentração, 0,01 e 0,001 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, obteve-se valores de  $u_{comb}$  superiores ao valor de  $U_{max}$ . Nos demais níveis, a  $u_{comb}$  foi inferior a  $U_{max}$ , atendendo ao critério de aceitabilidade.

Tabela 4.12: Valores de  $U_{max}$ , para pesticidas e HPAs, de acordo com o nível de concentração em avaliação.

Pesticidas		HPAs	
C (mg L <sup>-1</sup> )	$U_{max}$	C (mg L <sup>-1</sup> )	$U_{max}$
0,01	0,002358	0,001	0,000236
0,05	0,010078	0,005	0,001008
0,10	0,018043	0,010	0,002004

Os valores de LMR para grande partes dos pesticidas nas legislações para amostras vegetais e animais, estão nos níveis de concentração de 0,05 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>, assim sendo, nos níveis de maior relevância analítica, a incerteza do método atendeu ao critério de aceitabilidade (CE, 2005; GPO, 2017; ANVISA, 2017).

Para os HPAs, dos analitos que compõem o sistema de quatro substâncias específicas (PAH4), BaP, BaA, BbFA e CHR, fixados na União Europeia como os indicadores dos HPAs nos alimentos, o CHR e BaA apresentaram incerteza de medição adequada em todos os níveis avaliados e, BaP e BbFA mostram  $u_{comb}$  um pouco acima

da  $U_{\max}$  (Tabela 4.12), 12% e 4%, respectivamente. Porém, para os grupos de alimentos em que existe legislação para HPAs, foram estabelecidos limites em termos da soma dos PAH4 presentes, esses limites, na maioria dos casos, estão em uma faixa de 0,01 – 0,035 mg L<sup>-1</sup>, faixa na qual o método apresenta precisão adequada (CE, 2011).

#### 4.9. Análise de amostras comerciais de cachaça e frações de “cabeça”, “coração” e “cauda” de destilação

Os métodos otimizados foram empregados em 20 amostras comerciais, das quais 18 foram produzidas em 5 alambiques de diferentes regiões de Minas Gerais e 2 de um alambique da região de Paraty/RJ. Também foram analisadas frações de “cabeça”, “coração” e “cauda” de destilação dois alambiques de diferentes regiões de Minas Gerais.

Os resultados mostraram contaminação com 31 pesticidas e 12 HPAs entre as amostras analisadas (Tabela 4.13).

Tabela 4.13: Teores dos pesticidas e HPAs encontrados nas amostras e frações de "cabeça", "coração" e "cauda" de destilação, analisadas utilizando os métodos validados.

Amostra	Pesticidas		HPAs	
	Contaminante	Teor (mg L <sup>-1</sup> )	Contaminante	Teor (mg L <sup>-1</sup> )
A1	4-4-DDT Fenbuconazol	0,011 0,017	CPP	0,003
			BbFA	0,004
			BkFA	0,005
			BjFA	0,005
			BaP	0,007
A2	-	-	CPP	0,003
			BjFA	0,003
			BaP	0,003
A3	Fenbuconazol	0,012	BbFA	0,009
			BkFA	0,01
			BjFA	0,011
			BaP	0,022

Amostra	Pesticidas		HPAs	
	Contaminante	Teor (mg L <sup>-1</sup> )	Contaminante	Teor (mg L <sup>-1</sup> )
			IP	0,003
			DBahA	0,01
			BghiP	0,006
A4	-	-	-	-
			BaA	0,004
			CPP	0,003
			MCH	0,004
			BbFA	0,008
A5	Etrinfós	0,024	BkFA	0,009
	Fenbuconazol	0,017	BjFA	0,009
			BaP	0,018
			DBahA	0,005
			BghiP	0,004
			CPP	0,003
			MCH	0,002
			BbFA	0,012
			BkFA	0,012
A6	Carbofurano	0,013	BjFA	0,014
			BaP	0,029
			IP	0,004
			DBahA	0,018
			BghiP	0,013
			BaA	0,007
			CHR	0,002
			MCH	0,011
			BbFA	0,016
A7	-	-	BkFA	0,015
			BjFA	0,017
			BaP	0,029
			DBahA	0,003
			BghiP	0,001
A8	Carbofurano	0,017	CPP	0,004
	Cinidon etil	0,013	BbFA	0,003

Amostra	Pesticidas		HPAs	
	Contaminante	Teor (mg L <sup>-1</sup> )	Contaminante	Teor (mg L <sup>-1</sup> )
	Etrinfós	0,016	BaP	0,002
A9	Carbofurano Etrinfós	0,012 0,013	BaA	0,005
			CPP	0,003
			MCH	0,004
			BbFA	0,006
			BkFA	0,006
			BjFA	0,006
			BaP	0,009
			DBahA	0,002
A10	Tebuconazol Fenbuconazol	0,013 0,065	BaA	0,003
			CPP	0,003
			BbFA	0,005
A11	4,4-DDT	0,01	CPP	0,003
			BaP	0,004
			BghiP	0,002
A12	-	-	CPP	0,003
A13	-	-	BbFA	0,009
			BkFA	0,01
			BjFA	0,011
			BaP	0,02
			IP	0,002
			DBahA	0,005
A14	Fenbuconazol	0,034	BbFA	0,002
			BjFA	0,002
			BaP	0,004
A15	Dissulfotona sulfona	0,012		
	Fenbuconazol	0,128	BjFA	0,003
	Permetrina	0,013	BaP	0,002
	Resmetrina	0,017		
A16	Metamidofós	0,26	BbFA	0,012

Amostra	Pesticidas		HPAs	
	Contaminante	Teor (mg L <sup>-1</sup> )	Contaminante	Teor (mg L <sup>-1</sup> )
	Carbofurano	0,077	BkFA	0,012
			BjFA	0,013
			BaP	0,03
			DBahA	0,016
			BghiP	0,011
A17	-	-	-	-
A18	4,4-DDT Carbofurano	0,012 0,017	MCH	0,005
			BbFA	0,016
			BkFA	0,014
			BjFA	0,017
			BaP	0,035
			IP	0,004
			DBahA	0,015
BghiP	0,01			
A19	-	-	-	-
A20	-	-	CPP	0,003
			BbFA	0,009
			BkFA	0,01
			BjFA	0,01
			BaP	0,023
			IP	0,003
			DBahA	0,013
BghiP	0,009			
A21	Carbofurano Dissulfotona Etrinfós	0,045 0,301 0,057	CPP	0,003
			BbFA	0,007
			BkFA	0,008
			BjFA	0,008
			BaP	0,016
			IP	0,001
			DBahA	0,003
A22	4,4-DDT	0,014		
	Bromofós metil	0,011	-	-
	Cipermetrina	0,018		

Amostra	Pesticidas		HPAs	
	Contaminante	Teor (mg L <sup>-1</sup> )	Contaminante	Teor (mg L <sup>-1</sup> )
	Clopirifós	0,047		
	Fenclofós	0,01		
A23			CPP	0,003
			BbFA	0,004
	Buprofentezina	0,06	BkFA	0,005
	Carbofurano	0,019	BjFA	0,004
	Etrinfós	0,077	BaP	0,009
			IP	0,003
			DBahA	0,004
			BghiP	0,007
A24	2,4-D	0,019		
	4,4-DDT	0,1		
	Acrinatrina	0,021		
	Alacloro	0,014		
	Aldrin	0,012	BaA	0,006
	Ametrina	0,014	CHR	0,003
	Azoxistrobina	0,013	MCH	0,009
	Dissulfotona sulfona	0,025	BbFA	0,012
	Etrinfós	0,014	BkFA	0,011
	Fenclofós	0,016	BjFA	0,014
	Fenitrotona	0,016	BaP	0,021
	Permetrina	0,021	IP	0,003
	Quintozeno	0,011	DBahA	0,006
	Tolclofós metil,	0,013	BghiP	0,006
	Uniconazol-p	0,01	DBaiP	0,002
	Vinclosolina	0,017		
	Cipermetrina	0,027		
Ciprodinil	0,032			
A25	-	-	-	-
A26			BaA	0,003
			MCH	0,008
			BbFA	0,011

Amostra	Pesticidas		HPAs	
	Contaminante	Teor (mg L <sup>-1</sup> )	Contaminante	Teor (mg L <sup>-1</sup> )
			BkFA	0,011
			BjFA	0,012
			BaP	0,021
			IP	0,002
			DBahA	0,005
			BghiP	0,005

A análise das amostras, determinação e quantificação dos contaminantes, foi realizada através da interpolação das áreas de cada analito na curva de calibração preparada e injetada juntamente com as amostras.

Para os pesticidas, as contaminações foram numa faixa de 0,010 – 0,301 mg L<sup>-1</sup>, duas amostras apresentaram teores de pesticidas acima da faixa de trabalho da curva, 0,128 mg L<sup>-1</sup> de fenbuconazol e 0,301 mg L<sup>-1</sup> de dissulfotona, nas amostra A15 e A21 respectivamente. Para análise desses pesticidas nas amostras supracitadas, uma diluição adicional das amostras (1:4 v/v) foi realizada. Esses teores elevados de pesticidas é uma evidência que na produção da cachaça, ocorre uma concentração destes contaminantes, já que a produção de 60 – 80 litros de cachaça artesanal consomem cerca de uma tonelada de cana moída (ANDRADE, L. A. B., 2006).

Analisando as frações de destilação, pode-se observar que as duas amostras de frações de “coração” estavam livres de contaminação por pesticidas e as frações de “cabeça” também mostram pequena contaminação, apenas a amostra A3 apresentou contaminação de 0,012 mg L<sup>-1</sup> de fenbuconazol. Já nas frações de “cauda”, não verificou-se contaminação na amostra A2, e foram detectados 18 pesticidas na amostra A24. Entretanto, as amostras comerciais são frações de “coração” e várias apresentaram contaminações com pesticidas. Assim, não foi possível criar uma relação entre o processo de destilação da cachaça e a contaminação da bebida com pesticidas.

O pesticida de maior incidência nas amostras analisadas foi o fenbuconazol, presente em 10 amostras (Figura 4.12). Este pesticida não apresenta regulamentação, para nenhuma cultura no Brasil (ANVISA, 2017). Na EU e nos Estados Unidos, existem regulamentações específicas para fenbuconazol em diversas culturas, porém, apenas na EU existe LMR (0,05 mg kg<sup>-1</sup>) para cana-de-açúcar (CE, 2005; GPO, 2017).

O fenbuconazol é um fungicida da classe das triazinas, utilizado no tratamento foliar, pré e pós-colheita, em várias culturas de frutas e vegetais (MANCLÚS, J. J., 2008). Estudos apontaram para um aumento de casos de adenomas de fígado em ratos expostos a dieta contaminada com fenbuconazol (JUBERG, D. R., 2006). Os resultados desses estudos atentam para a necessidade de avaliação deste quanto à atividade cancerígena. (JUBERG, D. R., 2006; DELLARCO, V. L., 2005) A presença deste contaminante na cachaça e o não monitoramento representa um risco desconhecido para a saúde dos consumidores. O carbofurano, pesticida da classe dos carbamatos, foi outro pesticida de elevada incidência, presente em 7 amostras. Este é um inseticida que apresenta toxicidade aguda, podendo causar desde mal-estar, fraqueza muscular, tonturas e transpiração até, em situações críticas, depressão do sistema nervoso central levando ao estado de coma, convulsões e hipotonicidade. Também pode causar hipertensão, depressão cardiorrespiratória, dispneia, broncoespasmo e broncorreia com eventual edema pulmonar (PAN, 2017). Nos Estados Unidos o LMR deste em cana-de-açúcar é  $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ , já na EU o LMR é dez vezes menor,  $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$  (CE, 2005; GPO, 2017). O Brasil também apresenta legislação para este pesticida em vários alimentos, inclusive em cana-de-açúcar, no qual o LMR, igualmente aos Estados Unidos, é fixado em  $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ , com intervalo de segurança de 90 dias entre aplicação e colheita (ANVISA, 2017).

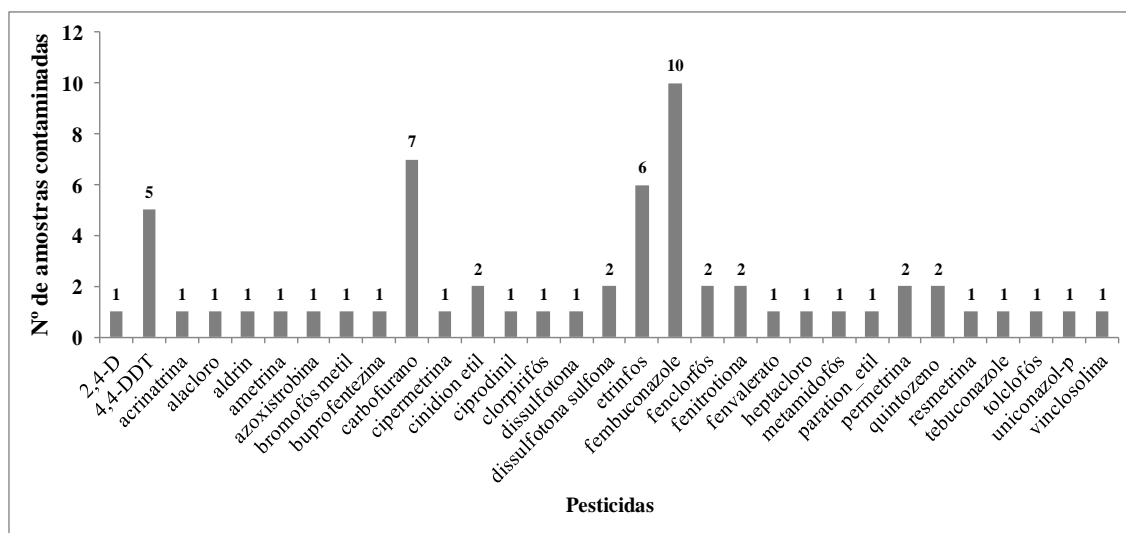


Figura 4.12: Número de amostras em que foi observada a presença de cada pesticida.

Para os HPAs, as contaminações foram numa faixa de  $0,001 - 0,029 \text{ mg L}^{-1}$ , com grande quantidade das amostras contaminadas em níveis acima dos limites estabelecidos para culturas que apresentam legislação para HPAs, uma vez que para

cana-de-açúcar não apresenta legislação em nenhum órgão, nacional ou internacional (CE, 2011). Entre os HPAs, o BaP foi o composto mais incidente, presente em 19 amostras, seguido por BbFA e BjFA, ambos presentes em 17 amostras. Deste três, o BaP e o BbFA integram o grupo PAH4, substâncias fixadas com marcadores da presença de HPAs em alimentos (CE, 2011).

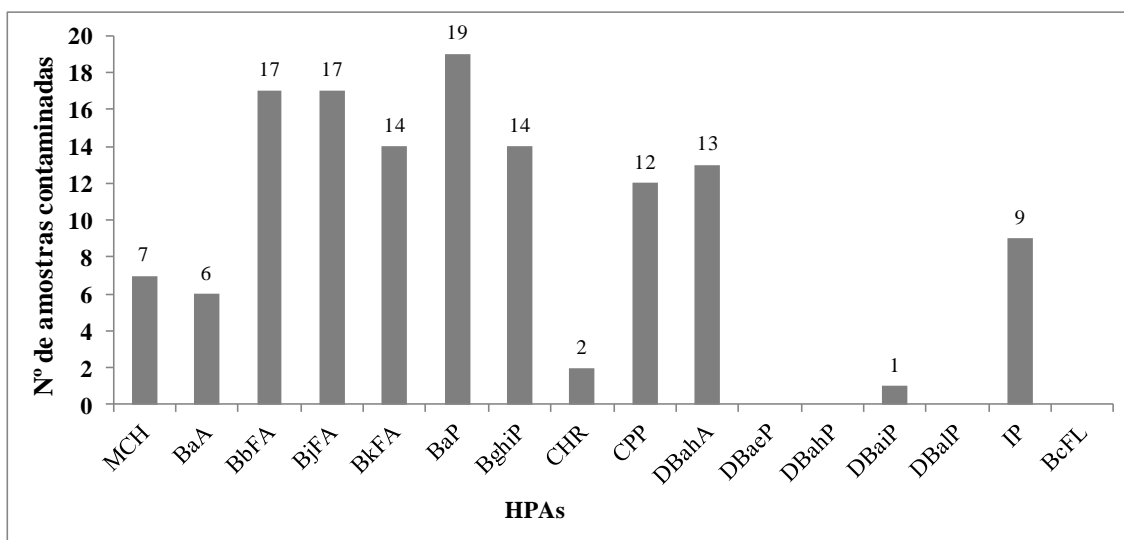


Figura 4.13: Número de amostras em que foi observada a presença de cada HPA.

A análise das amostras mostrou contaminação, tanto para pesticidas, quanto para HPAs, na maioria das amostras. Também apontou teores muito altos desses compostos, o que representa um risco invisível, uma vez que não há legislação para esse tipo de produto.

## 5. CONCLUSÃO

Este trabalho envolveu a otimização de três procedimentos de extração: extração líquido-líquido, extração em fase sólida e extração líquido-líquido com adição de sais, para análise de pesticidas em cachaça, utilizando planejamento de experimentos na avaliação dos fatores selecionados como mais relevantes, em cada procedimento. Após otimização, os procedimentos foram comparados, em termos de recuperação e repetibilidade, sendo o procedimento de extração líquido-líquido com adição de sais o que forneceu os resultados mais satisfatórios. A concentração de  $0,025 \text{ mg L}^{-1}$  também foi fixada, com base nos resultados obtidos na comparação, como nível mínimo de análise para pesticidas. Posteriormente, o procedimento selecionado foi avaliado quanto sua adequação para determinação de HPAs, o qual também mostrou ser eficiente.

A validação envolveu a avaliação dos parâmetros: linearidade, veracidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), LD, LQ e incerteza de medição. Os critérios mínimos de aceitabilidade seguiram as recomendações preconizadas pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA e o documento guia SANTE/11945/2015 da Comissão Europeia. A faixa de trabalho estabelecida foi:  $0,01 - 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ , para os pesticidas e  $0,001 - 0,01 \text{ mg L}^{-1}$ , para os HPAs. A linearidade foi avaliada ao nível de 95% de confiança, apresentando  $t_r$  calculado maior que o valor crítico. A veracidade e precisão (repetibilidade e precisão intermediária) foram avaliadas em termos de recuperação e coeficiente de variação, para os pesticidas: R entre 81 – 113% e  $CV \leq 20\%$  (exceto para lambda cialotrina e metamidofós) e para os HPAs: R entre 84,76 – 120,78% e  $CV \leq 27,33\%$ . Os LDs alcançados foram de  $0,0025$  e  $0,00025 \text{ mg L}^{-1}$  e os LQs de  $0,01$  e  $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ , para pesticidas e HPAs, respectivamente. A incerteza de medição estimada foi adequada, nos níveis de maior relevância analítica.

Assim, foram desenvolvidos dois métodos multirresíduos para determinação de 95 pesticidas e 16 HPAs, em cachaça, por GC-MS/MS, utilizando um único procedimento de preparo de amostra: extração líquido-líquido com adição de sais. Após validação dos métodos, amostras comerciais de cachaça e frações de “cabeça”, “coração” e “cauda” de destilação de dois alambiques foram analisadas. As amostras analisadas apresentaram contaminações de 31 pesticidas, numa faixa de  $0,01 - 0,301 \text{ mg L}^{-1}$ . O pesticida com maior incidência foi o fenbuconazol, presente em 10 amostras.

Este pesticida não apresenta regulamentação nacional. Os Estados Unidos e EU apresentam regulamentações para este em diversas culturas, porém apenas na EU inclui regulamentação para cana-de-açúcar (LMR = 0,05 mg kg<sup>-1</sup>). O não monitoramento deste pesticida em cachaça revela uma ameaça à saúde dos consumidores, uma vez que diversas amostras apresentaram teores acima de 0,05 mg L<sup>-1</sup>. Para os HPAs, foi verificada a presença de 12 dos 16 compostos analisados, a faixa de contaminação foi de 0,001 – 0,29 mg L<sup>-1</sup>, uma porcentagem elevada das amostras apresentaram contaminação em níveis acima dos limites estabelecidos para culturas que apresentam legislação específica, o que não ocorre para cana-de-açúcar. O BaP foi o composto presente em maior número de amostras, presente em 19 amostras. Além deste, também se destacaram o BbFA e o BjFA, ambos presentes em 17 amostras.

Os resultados obtidos na análise das amostras de cachaça ressaltam a relevância do desenvolvimento de métodos que identifiquem e quantifiquem pesticidas e HPAs. Também ressaltam a necessidade da criação de legislação para esses contaminantes, além do estudo e avaliação das técnicas de manejo e produção para detectar as principais fontes de contaminação da cachaça durante o processo. Para assim, realizar a padronização do procedimento de produção, a fim de assegurar a qualidade do produto brasileiro.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. *ABNT NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro, 2005.

ALCARDE, A. R. *Cachaça: ciência, tecnologia e arte*, ed. única, Blucher, São Paulo, 2014.

ANDRADE, L. A. B. *Cultura da cana-de-açúcar*. IN: CARDOSO, M. G. *Produção de aguardente de cana*. 2. ed. Lavras: UFLA, p. 25 – 67, 2006.

ANDRADE, L. P.; ANDRADE, L. F. S. *Cachaça sob uma perspectiva histórica, cultural e simbólica*. In: XVIII SemeAd – Seminários em Administração, 2015. Disponível em: <<http://sistema.semead.com.br/18semead/resultado/trabalhosPDF/1338.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2017.

ANJOS, J. P. *Compostos fenólicos e carbamato de etila: caracterização e quantificação em diferentes períodos do envelhecimento da cachaça em tonel de carvalho (Quercus sp)*, 2010. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Programa de Pós-graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

ANVISA. *Regularização de Produtos – Agrotóxicos*. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 22 jun. 2017.

AOAC. *AOAC Official methods of analysis. Appendix D: guides for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis*. AOAC, 2002.

BARRIGOSI, J. A. F. *Uso agrotóxicos*. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fohg6co02wyiv8065610dc2ls9ti.html>>. Acesso em: 21 jun. 2017.

BETTIN, S. M.; FRANCO, D. W. *Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em aguardentes*. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.25, p. 234 – 238, 2005.

BRAGA, M. V. F.; KIYOTANI, I. B. *A cachaça como patrimônio: turismo cultura e sabor*. *R. Tur. Contemp.*, v. 3, p. 254 – 275, 2015.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos Agrotóxicos. *Quim. Nova Esc*, v. 34, p. 10 – 15, 2012.

BRASIL. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar – Safra 2015/2016. Lex: Conab, Brasília, 2015, 65 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução nº 274, Brasília, 22 de setembro de 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução nº 2, Brasília, 15 de janeiro de 2007.

BRASIL. Decreto nº 4.062, de 21 de dezembro de 2001. Define as expressões "cachaça", "Brasil" e "cachaça do Brasil" como indicações geográficas e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 26 dez. 2001. Seção 1, p. 4.

BRASIL. Decreto nº 34.645, de 14 de abril de 1993. Regulamenta a Lei nº 10.853, de 4 de agosto de 1992, que cria o Programa Mineiro de Incentivo à Produção de Aguardente - Pró- Cachaça, e dá outras providências. Lex: Diário do Executivo- Minas Gerais, 1993.

BRASIL. Decreto nº 2314, de 04 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei nº 8918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. *Diário Oficial da União*, Brasília, 5 set. 1997. Seção 1, p. 19549.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. *Diário Oficial da União*, Brasília, 12 jul. 1989.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa nº20, de 25 de outubro de 2005. *Diário Oficial da União*, Brasília, 26 out. 2005. Seção 1, p. 1.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Resíduos e Contaminantes em Alimentos*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS nº 2914, Brasília, 12 de dezembro de 2011.

- CABRAS, P.; ANGIONI, A.; GARAU, V. L.; MINELLI, E. V.; MELIS, M.; PIRISI, F. M. Pesticides in the distilled spirits of wine and its byproducts. *J. Agric. Food Chem.*, v. 45, p. 2248 – 2251, 1997.
- CACHO, J. I.; CAMPILLO, N.; VIÑAS, P.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Evaluation of the contamination of spirits by polycyclic aromatic hydrocarbons using ultrasound-assisted emulsification microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.*, v. 190, p. 324 – 330, 2016.
- CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 67, p. 1 – 27, 2008.
- CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Optimization of the benzo(a)pyrene determination procedure in cachaça. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 20, p. 502 – 508, 2009.
- CE. Recomendação 2005/108/CE da Comissão de 4 de fevereiro de 2005. *Jornal Oficial da União Europeia*, p. L 34/43 - L 34/45, 2005.
- CE. Regulamento (CE) nº 208/2005 da Comissão de 4 de fevereiro de 2005. *Jornal Oficial da União Europeia*, p. L 34/3 - L 34/5, 2005.
- CE. Regulamento (CE) nº 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de fevereiro de 2005. *Jornal Oficial da União Europeia*, 1766 p., 2005.
- CE. Regulamento (CE) nº 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro de 2006. *Jornal Oficial da União Europeia*, p. L70/12-L70/34, 2006.
- CE. Regulamento (EU) nº 835/2011 da Comissão de 19 de agosto de 2011. *Jornal Oficial da União Europeia*, p. L 215/4 - L 215/8, 2011.
- DELLARCO, V. L.; BAETCKE, K. A Risk Assessment Perspective: Application of Mode of Action and Human Relevance Frameworks to the Analysis of Rodent Tumor Data. *Toxicol. Sci.*, v. 86, p. 1 – 3, 2005.
- ESPINOZA, L. J. S. Tecnologia de produção de cachaça: princípios do processo de produção de cachaça de qualidade. In: Minicurso sobre tecnologia na produção de cachaça, 2006. Conselho Regional de Química IV Região (SP/MS). Disponível em: <[http://www.crq4.org.br/downloads/tec\\_cachaca.pdf](http://www.crq4.org.br/downloads/tec_cachaca.pdf)>. Acesso em: 17 jun. 2017.

EUGRIS. Further description: - Persistent Organic Pollutants. Disponível em: <<http://www.eugris.info/FurtherDescription.asp?e=93&Ca=2&Cy=0&T=Persistent%20Organic%20Pollutants>>. Acesso em: 17 jun. 2017.

EU/SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD. Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food – 2002. Bruxelas, 2002. 84 p.

FARIA, R. G. B. *Estudo de consumo de cachaça artesanal em bares e botequins no município do Rio de Janeiro*, 2002. Dissertação (Mestrado em Administração) – Instituto COPPEAD de Administração, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

FEITOSA, P. C. L. *A cachaça como identidade cultural*, 2005. Monografia (Curso de Excelência em Turismo) – Centro de Excelência, Universidade de Brasília, Brasília.

GALINARO, C. A.; FRANCO, D. W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em cachaça, rum, uísque e álcool combustível. *Quim. Nova*, v. 32, p1447 – 1451, 2009.

GALINARO, C. A.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Profiles of polycyclic aromatic hydrocarbons in brazilian sugar cane spirits: discrimination between cachaças produced from nonburned and burned sugar cane crops. *J. Agric. Food Chem.*, v.55, p. 3141 – 3147, 2007.

GARCIA, L. P.; GONÇALVES, B. L.; PANHO, G.; SCUSSEL, V. M. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em alimentos: uma revisão. *PUBVET*, Londrina, v. 8, n. 19, p. 2292 – 2450, 2014.

GARCÍA-FALCÓN, M. S.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in alcoholic drinks and the identification of their potential sources. *Food Addit Contam.*, v. 22, p.791 – 797, 2005.

GPO. *Electronic Code of Federal Regulations*. Disponível em: <[https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=186c36f172c2a5f98f740677f73ae152&node=40:24.0.1.1.27&rgn=div5#se40.26.180\\_11](https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=186c36f172c2a5f98f740677f73ae152&node=40:24.0.1.1.27&rgn=div5#se40.26.180_11)>. Acesso em: 21 jun. 2017.

HAN, Y.; HUANG, B.; LIU, S.; ZOU, N.; YANG, J.; ZHONG, Z.; ZHANG, X.; SONG, L.; QUIN, Y.; PAN, C. Residue levels of five grain-storage-use insecticides during the production process of sorghum distilled spirits. *Food Chem.*, v. 206, p. 12 – 17, 2016.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl. Chem.*, v. 67, p. 331 – 343, 1995.

IBRAC. Mercado Externo. *Instituto Brasileiro da Cachaça*, Brasília, 08 fev. 2017. Disponível: <<http://www.ibrac.net/index.php/servicos/estatisticas/mercado-externo>>. Acesso em: 07 ago. 2017.

INMETRO, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais de termos associados (VIM 2012). Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO, Rio de Janeiro, 2012.

INOUE, T.; NAGATOMI, Y.; KINAMI, T.; UYAMA, A.; MOCHIZUKI, N. Fate of pesticides in a distilled spirit of barley shochu during the distillation process. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 74, p. 2518 – 2522, 2010.

MANCLÚS, J. J.; MORENO, M. J.; PLANA, E.; MONTOYA, A. Development of monoclonal immunoassays for the determination of triazole fungicides in fruit juices. *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, p. 8793 – 8800 2008.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; FLÁVIO ANASTÁCIO CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Cienc. Rural*, v. 37, p. 1192 – 1201, 2007.

JUBERG, D. R.; MUDRA, D. R.; HAZELTON, G. A.; PARKINSON, A. The effect of fenbuconazole on cell proliferation and enzyme induction in the liver of female CD1 mice. *Toxicol. Appl. Pharm.*, v. 214, p. 178 – 187, 2006.

LIN, D.; TU, Y.; ZHU, L. Concentrations and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea. *Food Chem. Toxicol.*, v. 43, p. 431 – 48, 2005.

LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. 1. ed. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

MACHADO, A. M. R.; CARDOSO, M. G.; DÓREA, H. S.; EMÍDIO, E. S.; SILVA, M. M. S.; ANJOS, J. P.; SACZK, A. A.; NELSON, D. L. Contamination of cachaça by PAHs from storage containers. *Food Chem.*, v. 146, p. 65 – 70, 2014.

MAJORS, R. E. Overview of Sample Preparation. *LCGC cromatographyonline*, Nova Jérsei, 01 nov. 2015. Disponível em: <<http://www.chromatographyonline.com/overview-sample-preparation> >. Acesso em: 09 ago. 2017.

MAPA DA CACHAÇA. A História da Cachaça. *Mapa da Cachaça*, São Paulo, 16 ago. 2011. Disponível em: < <http://www.mapadacachaca.com.br/artigos/historia-da-cachaca/>>. Acesso em: 17 jun. 2017.

BRAGA, M. V. F.; KIYOTANI, I. B. A cachaça como patrimônio: turismo cultura e sabor. *R. de Tur. Contemp.*, v. 3, p. 254 – 275, 2015.

MENEZES, H. C.; PAULO, B. P.; PAIVA, J. N.; BARCELOS, S. M. R.; MACEDO, D. F. D.; CARDEAL, Z. L. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in artisanal cachaça by DI-CF-SPME-GC/MS. *Microchem. J.*, v. 118, p. 272 – 277, 2015.

MILHORANCE, F. *Brasil lidera o ranking de consumo de agrotóxicos*. O Globo, Rio de Janeiro, 08 abr. 2015, Saúde. Disponível em: <<https://oglobo.globo.com/sociedade/saude/brasil-lidera-ranking-de-consumo-de-agrotoxicos-15811346#ixzz3WkSvrqan>>. Acesso em: 21 jun. 2017.

MERK. Ficha de informações de segurança de produtos. Alemanha, 2017.

NAGHETTINI, M; PINTO, E.J.A. *Hidrologia Estatística*. Serviço Geológico do Brasil, Belo Horizonte, 2007.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R.E. Como fazer experimentos, 4º ed., Bookman, Porto Alegre, 2010.

NETTO, A. D. P.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E.V. O.; ARBILLA, G., FERREIRA, L. F. V.; OLIVEIRA A. S.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por

hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NPHAs): uma revisão metodológica. *Quim Nova*, v. 23, p. 765 – 773, 2000.

NIST POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON STRUCTURE INDEX. NIST *PAH Database*. NIST Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Structure Index. Disponível em: <<http://pah.nist.gov/beta/index.html>>. Acesso em: 24 jun. 2017.

NOBREGA, H. F. Pesticidas: propriedade, toxicologia, problemas e soluções, 2014. Disponível em: <<http://www.webartigos.com/artigos/pesticidas-classificacao-propriedades-toxicidade-problemas-e-solucoes/121404/>>. Acesso em: 21 jun. 2017.

PAN. *Pesticides Database*. Pesticide Action Network. Disponível em: <<http://www.pesticideinfo.org/>>. Acesso em: 24 jun. 2017.

PISQ. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos não heterocíclicos selecionados. Relatório, Genebra, 1998. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm>>. Acesso em: 17 jun. 2017.

PORTAL BRASIL. *Cachaça é reconhecida com produto brasileiro pelos EUA*. Brasil, Brasília, 27 mar. 2013. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/governo/2013/03/cachaca-e-reconhecida-como-produto-brasileiro-pelos-eua>>. Acesso em: 17 jun. 2017.

QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; ROSA, M. A. Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QuEChERS E UPLC-MS/MS. *Quim. Nova*, v. 35, p. 185 – 192, 2012.

SANTE, European Commission. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Directorate-general for health and food safety, 2015.

SANTOS, S. P. A química dos Inseticidas (parte I). In: *Química*. Lisboa: SoQuímica, Faculdade de Ciência- Universidade de Lisboa, Lisboa, 2002.

SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; DACOSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Quim. Nova*, v. 30, p. 159 – 170, 2007.

SÃO PAULO. Governo do Estado de São Paulo. Lei n. 11.241, de 19 de setembro de 2002. *Dispõe sobre a eliminação gradativa da queima da palha da cana-de-açúcar e dá providências correlatas*. São Paulo, 2002.

SAVOY, V. L. T. Classificação dos agrotóxicos. *Biológico*, São Paulo, v. 73, p. 91 – 92, 2011.

SINDIVEG. *Balanco 2015 – Setor de agroquímicos confirma queda de vendas*. São Paulo, 2016. Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/balanco-2015-setor-de-agroquimicos-confirma-queda-de-vendas/>>. Acesso em: 22 jun. 2016.

SOUZA, L. C. *Responsabilidade civil por danos à saúde decorrentes do uso de agrotóxicos no ambiente rural*, 2017. 185 f. Dissertação (Mestrado em Direito Agrário) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SOUZA, S. V.C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos*, 2007. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

TFOUNI, S. A. V.; MACHADO, R. M. D.; CAMARGO, M. C. R., VITORINO, S. H. P.; VICENTE, E.; TOLEDO, M. C.F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaça by HPLC with fluorescence detection. *Food Chem.*, v. 101, p. 334 – 338, 2007.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. *Biológico*, São Paulo, v. 64, p. 135 – 142, 2002.

VILARINHO, F. *Pesticidas*, 2011. Disponível em: <<http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/772/1/Pesticidas%202011.pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2017.

XU, H.; FEI, Q., SHAN, H.; HUAN, Y.; MI, H., ZHANG, H.; LI, G.; FENG, G. An improved pneumatic nebulization gas-solid microextraction device used to detect triazine herbicides in white spirit. *Anal. Sci.*, v. 32, p. 183 – 188, 2016.

WANG, J.; GAO, L.; HAN, D.; PAN, J.; QIU, H.; LI, H.; WEI, X.; DAI, J.; YANG, J.; YAO, H.; YAN, Y. Optical detection of  $\lambda$ -cyhalothrin by core-shell fluorescent

molecularly imprinted polymers in chinese spirits. *J. Agric. Food Chem.*, v. 63, p. 2392 – 2399, 2015.

WANG, Y.; WANG, F.; YU, C.; LI, N.; ZHANG, R.; REN, R.; ZHANG, H. Pneumatic nebulization gas–solid extraction of some pesticides in liquor. *J. Chromatogr. A*, v. 1253, p. 11 – 15, 2012.

WENZL, T.; SIMON, R.; KLEINER, J.; ANKLAM, E. Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *Trends Analyt. Chem.*, v. 25, p. 716 – 725, 2006.

WHO/IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Volume 89, 2007. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/ENG/recentpub/mono89.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2017.

WHO/FAO - JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. Summary and conclusions. Roma, 2005. 47 p. Disponível em: <[ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/jecfa64\\_summary.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/jecfa64_summary.pdf)>. Acesso em: 17 mai. 2017