

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**INSETICIDAS PIRETRÓIDES: DO DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO AO NÍVEL
DE RESÍDUOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL**

Alexsandro Dallegrave

Porto Alegre, julho de 2017.

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Alexsandro Dallegrave

**INSETICIDAS PIRETRÓIDES: DO DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO AO
NÍVEL DE RESÍDUOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL**

**Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Química da UFRGS como um dos requisitos
para obtenção do título de Doutor.**

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Mara Pizzolato

Porto Alegre, julho de 2017.

"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante."

Albert Schweitzer

Dedicatória

Dedico este trabalho àqueles que despendem tempo de vida em prol de um planeta melhor para todas as formas de vida. Dedico igualmente aos meus pais Arlindo e Teresinha que dignamente me apresentaram à importância da família e ao caminho da honestidade, bondade e persistência.

Especialmente dedico à minha esposa Vanessa que sempre me apoiou e ajudou a manter o foco com suas excelentes aulas de yoga, foi compreensiva, principalmente nos 7 meses que estive em Barcelona realizando parte do doutorado.

Agradecimentos

À orientadora e amiga Dra. Tânia Mara Pizzolato, pelo apoio incondicional, pelo exemplo de profissional e pela dedicação em desenvolver pesquisa científica. Também agradeço pela oportunidade dada, de realizar parte do doutorado em Barcelona (Espanha), período único em minha vida, com muitos aprendizados científicos e de vida.

Ao Instituto de Química da UFRGS por sempre ter colaborado com a dupla jornada (trabalho e estudo), principalmente apoiando os afastamentos que foram necessários para execução deste trabalho.

Ao Dr. Damià Barceló e a Dra. Ethel Eljarrat que me acolheram e orientaram no período que estive no IDAEA-CSIC (Espanha) desenvolvendo parte deste trabalho.

Aos colegas do IDAEA-CSIC, especialmente Marianne Kock Schulmeyer, Cayo Corcellas, Enrique Baron, Aline Mizukawa, Cristina Bosch, Alejandro Margareto, Oscar Aznar Alemany, Dani B., Gabriela, Jaume Acena e Meritxell Mallen.

Aos meus colegas de trabalho e amigos do laboratório D-118 por todo apoio prestado. Especialmente a Márcia klipstein, Alan Silva, Marco Antônio dos Santos, Lucas Barnet e Artur Rocha, Vicente Guedes e Juliano. Assumiram responsabilidades que seriam minhas para que eu pudesse desenvolver as atividades que originaram esta tese.

Ao meu amigo Mauro Henrique Dartora pelas longas conversas filosóficas e principalmente por ter assumido minha responsabilidade no setor de cromatografia no período em que estive em Barcelona.

A amiga Tauane Sudbrack por todo apoio prestado na fase inicial do projeto.

Aos meus colegas de trabalho e amigos do laboratório D-107 por todo apoio prestado. Sempre estavam disponíveis para ajudar e para tomar um café. Especialmente Juliana Arsand, Carol, Martha, as Natálias e o Eduardo.

A bolsista Renata Martins e a Prof. Carla Sirtori que deram todo suporte no período que estive afastado do trabalho no QTOF. Também pela amizade e palavras de apoio.

Aos colegas do LANAGRO/RS, por todo suporte em relação as amostras utilizadas neste trabalho, sempre colaboraram de forma muito ativa, especialmente ao Fabiano Barreto, Vinícius Bicca, Ugo Souza, Leonardo Meneghini e Louise Jank.

Aos professores, funcionários e ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da UFRGS.

À CAPES, pela bolsa concedida no sanduiche em Barcelona.

DIVULGAÇÃO E PUBLICAÇÃO DO TRABALHO ATÉ O MOMENTO

- Participação no congresso SETAC-2015 (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) Latin America 11th Biennial Meeting Buenos Aires 7-10 September 2015 Argentina, com o trabalho intitulado de **“Contamination of bovine milk by pyrethroids: a chronic risk”**.
- Apresentação do trabalho intitulado de **“Pesticidas piretróides em alimentos de origem animal”** no I Workshop sobre Qualidade de Águas e Alimentos (26 de janeiro de 2016) realizado em Porto Alegre.
- Artigo 1 intitulado **“Methodology for trace analysis of 17 pyrethroids and chlorpyrifos in foodstuff by gas chromatography–tandem mass spectrometry”** publicado na revista Analytical and Bioanalytical Chemistry (November 2016, Volume 408, Issue 27, pp 7689–7697).
- Artigo 2 intitulado **“Residue of Insecticides in Foodstuff and Dietary Exposure Assessment of Brazilian Citizens”** aceito para publicação na revista Food and Chemical Toxicology.

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	II
AGRADECIMENTOS	III
DIVULGAÇÃO E PUBLICAÇÃO DO TRABALHO ATÉ O MOMENTO	V
ÍNDICE.....	VI
LISTA DE FIGURA	VIII
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE APÊNDICES	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 JUSTIFICATIVA	3
3 OBJETIVOS.....	4
3.1 OBJETIVO GERAL	4
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
4.1 INSETICIDAS PIRETRÓIDES.....	5
4.1.1 <i>Origem e evolução dos piretróides</i>	5
4.1.2 <i>Propriedades físico-químicas</i>	6
4.1.3 <i>Utilização</i>	7
4.1.4 <i>Diretrizes de uso</i>	8
4.1.5 <i>Toxicologia</i>	11
4.2 CLORPIRIFÓS	15
4.3 ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL: MÚSCULO BOVINO, DE PEIXE, DE FRANGO, OVOS E LEITE.	16
4.3.1 <i>Ovos de Gallus gallus domesticus</i>	18
4.3.2 <i>Leite</i>	18
4.3.3 <i>Músculo bovino e de frango</i>	19
4.3.4 <i>Peixe</i>	19
4.4 METODOLOGIAS DE ANÁLISE PARA PIRETROIDES	19
4.4.1 <i>Preparo de amostra</i>	19
4.4.2 <i>Técnicas instrumentais</i>	25
4.5 METODOLOGIA DE ANÁLISE PARA CLORPIRIFÓS	31
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
5.1 PADRÕES E REAGENTES	32
5.2 AMOSTRAGEM.....	32
5.2.1 <i>Amostras de leite coletadas de animal com histórico de aplicação de inseticida</i>	32
5.3 LIOFILIZAÇÃO	33
5.4 TEOR DE LIPÍDIOS	33
5.5 EXTRAÇÃO E <i>CLEAN UP</i>	34
5.6 CONDIÇÕES DA ANÁLISE POR GC/NCI-MS/MS	34
5.7 CONFIABILIDADE DOS RESULTADOS ANALÍTICOS	35
5.8 PERFIL ISOMÉRICO	36
5.9 ESTIMATIVA DA INGESTA DIÁRIA	37

6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6.1	TEOR DE LIPÍDIOS	39
6.1.1	<i>Relação entre o teor de lipídios e a quantidade de inseticidas.....</i>	40
6.1.2	<i>Análises da clara e gema segregadas.....</i>	41
6.2	MÉTODO ANALÍTICO	42
6.2.1	<i>Cromatografia a Gás com Ionização Química no modo Negativo acoplado a Espectrometria de Massa em tandem.....</i>	42
6.2.2	<i>Etapa de Extração e Clean up</i>	44
6.2.3	<i>Recuperação</i>	45
6.2.4	<i>Precisão intermediária</i>	49
6.2.5	<i>Limites de detecção e quantificação.....</i>	50
6.3	AMOSTRAS REAIS	51
6.3.1	<i>Quantificação e taxa de detecção.....</i>	51
6.3.2	<i>Incidência do número de inseticidas por amostra</i>	54
6.3.3	<i>Aplicação pour on de cipermetrina</i>	56
6.3.4	<i>Perfil isomérico</i>	57
6.4	LIMITES MÁXIMOS DE RESÍDUOS E ESTIMATIVA DA INGESTA DIÁRIA	60
7	CONCLUSÕES	64
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
9	REFERÊNCIAS	67

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Classes de agrotóxicos encontrados em alimentos de origem vegetal e animal, no Brasil ⁽¹⁶⁻²⁹⁾	2
Figura 2. Estrutura básica das piretrinas naturais.	6
Figura 3. Estrutura química da cipermetrina, piretróide do tipo II.....	6
Figura 4. Estrutura química da bifentrina com dois centros quirais (A) e da ciflutrina que apresenta três centros quirais (B).	7
Figura 5. Piretróide permetrina com as frações ácida e alcoólica destacadas.	13
Figura 6. Metabólitos mais comuns provenientes dos piretróides (3-PBA ácido 3-fenoxi-benzóico; 4-F-3-PBA ácido 3-fenoxi 4-fluor-benzóico; DCCA 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetil-ciclopropano ácido carboxílico; DBCA 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetil-ciclopropano ácido carboxílico).	14
Figura 7. Isômeros <i>trans</i> e <i>cis</i> da fração ácida dos piretróides. Setas estão indicando a intensidade da biotransformação.	14
Figura 8. Estrutura química do organofosforado clorpirifós.	15
Figura 9. Estruturas dos produtos de degradação CLO-OXO e TCP oriundos do CLO.....	15
Figura 10. Caracterização das matrizes ovos, leite, músculo bovino, de frango e de peixe (% em peso úmido) e distribuição porcentual dos principais lipídios entre as matrizes.....	17
Figura 11. Processo de cavitação formado por ultrassom. [adaptado da Hielscher].	23
Figura 12. Etapas da SPE na <i>clean up</i>	24
Figura 13. Representação esquemática de um cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massa.....	27
Figura 14. Representação da ionização por impacto eletrônico.	28
Figura 15. Representação da formação dos elétrons térmicos e íons reagentes (IR) a partir do gás reagente (GR).	29
Figura 16. Representação esquemática de um espectrômetro de massa em tandem com analisadores quadrupolos lineares. [adaptado da Agilent ¹³⁴].	31
Figura 17. Metodologia utilizada para verificar a recuperação dos analitos nas diferentes matrizes (frango, bovino, peixe, leite e ovos).....	36

Figura 18. Cromatogramas sobrepostos referentes às transições m/z 207-35 da cipermetrina (ovo 4) e m/z 205-121 da bifentrina (ovo 2) oriundos de análises separadas de clara (C) e gema (G).	42
Figura 19. Representação do cromatograma da permetrina, ciflutrina (CIF) e cipermetrina (CIP) utilizando diferentes colunas, e evidenciando os isômeros <i>cis</i> (I e III) e isômeros <i>trans</i> (II e IV).	43
Figura 20. Representação do modo de aquisição MRM no espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo para o piretróide cipermetrina.	44
Figura 21. Recuperação média para todos os inseticidas avaliados nos níveis de fortificação (1 e 5 ng), massa de lipídios e a barra de erros expressa em desvio padrão nas diferentes matrizes.	46
Figura 22. Comparativo dos resultados de recuperação entre diferentes métodos de extração/ <i>clean up</i> publicados e o aplicado neste trabalho. Sobre as barras estão os níveis de fortificação em $\mu\text{g kg}^{-1}$	48
Figura 23. Valores do FI para os piretróides imiprotrina, resmetrina, tetrametrina, fenotrina, cialotrina, permetrina, ciflutrina, cipermetrina, fenvalerato, fluvalinato e flumetrina com barras de erros representando o desvio padrão.	49
Figura 24. Porcentagem dos resultados positivos acima do LD nas amostras de músculo bovino, de frango, de peixe, ovos e leite.	51
Figura 25. A - Proporção em massa do inseticida específico nas diferentes matrizes, B - proporção em massa dos diferentes inseticidas na matriz específica.	53
Figura 26. % das amostras e número de inseticidas encontrados em cada amostra expresso em porcentagem do número total de amostras para a matriz específica.	54
Figura 27. Variação da concentração e valores do fator isomérico (FI) da cipermetrina (CIP) no leite em um animal tratado com CIP via <i>pour on</i> em intervalo de 12 h para cada ordenha.	56
Figura 28. Monitoramento dos picos cromatográficos referentes a CIP para os 4 isômeros (<i>cis</i> 1, <i>cis</i> 2, <i>trans</i> 1, <i>trans</i> 2) no leite em um animal tratado com CIP via <i>pour on</i>	57
Figura 29. Valores médios do fator isomérico calculados nas amostras positivas comparados com o FI médio calculado nos testes de recuperação (FI-controle), barras representam o DP e o n o número de amostras.	58

Figura 30. Cromatogramas da CIP (transição m/z 207-35) com 4 sinais, dois com isomeria *cis* e dois *trans* de uma amostra positiva de músculo bovino (preto) e do músculo bovino fortificado com CIP(cinza).59

Figura 31. Fator isomérico (FI) da CIP presente em 13 produtos comerciais..... 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de produtos comerciais registrados para utilização na agricultura e medicina veterinária nas bases do agrofit e agrolink.....	10
Tabela 2. Toxicidade aguda oral em ratos e níveis de toxicidade para humanos dos piretróides do tipo I e II.	12
Tabela 3. Teor médio de lipídio e de água nas matrizes: músculo bovino, de frango, de peixe, ovos e leite e desvio padrão relativo (n=3).....	39
Tabela 4. Relação entre o teor de lipídios e a quantidade de piretróides e CLO nas matrizes de: músculo bovino, de frango, de peixe, ovos e leite representada pela correlação de Spearman.	40
Tabela 5. Resultados positivos para a concentração de piretróides (BIF, CIA e CIP) em ovos com segregação entre clara e gema ($\mu\text{g kg}^{-1}$).	41
Tabela 6. Comparação entre os LQ de estudos similares publicados na literatura científica. .	50
Tabela 7. LMRs estabelecidos pelas IN-13 PNCRC/animal-2015 e IN-09-PNCRC/animal-2017.	61
Tabela 8. Valores estimados da ingesta diária de resíduos de inseticidas, utilizando para cálculo a média das concentrações encontradas e uma estimativa crítica utilizando os valores extremos de concentração e os valores de ingesta diária aceitável.....	62

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A. Tabela com os valores de LMRs de diferentes referências internacionais como a EC, EPA-US, Códex, JFCRF e nacional PNCRC/Animal 2017 para a BIF, CIF, λ -CIA, CIP, DEL, PER, FEN e CLO em músculo bovino, de frango, de peixe, ovos e leite.	88
Apêndice B. Revisão da literatura científica ressaltando a metodologia de análise dos piretróides, tipos de alimentos de origem animal, recuperação e limites de detecção e quantificação, estes dados foram extraídos de artigos pesquisados na base de dados <i>web of knowledge</i> ¹⁵	89
Apêndice C. Fórmulas moleculares e estruturais dos inseticidas utilizados neste trabalho e suas massas moleculares (MM - g mol ⁻¹).	94
Apêndice D. Tempo de retenção, faixa linear, coeficiente de determinação, transições monitoradas, energias de colisão e valores de <i>Dwell</i> para os 17 piretróides e clorpirifós avaliados	97
Apêndice E. Amostras após a extração assistida por ultrassom e centrifugação.....	98
Apêndice F. <i>Tandem</i> de cartuchos de alumina básica e C18 utilizados na etapa de <i>clean up</i> .	99
Apêndice G. Recuperação e desvio padrão relativo para os níveis de fortificação de 1 e 5 ng.	100
Apêndice H. Fator isomérico calculado a partir dos testes de recuperação.....	101
Apêndice I. Precisão intermediária (%) para a fortificação de 1 ng nas diferentes matrizes	102
Apêndice J. LD e LQ (ng kg ⁻¹) dos piretróides e clorpirifós utilizando método via GC/NCI-MS/MS em matrizes de origem animal. Os LDs e LQs para a matriz leite estão em ng L ⁻¹	103
Apêndice K. Níveis máximos, mínimos, médias, taxa de detecção e comparativos com os LMRs para os inseticidas detectados em cada uma das amostras das diferentes matrizes.	105
Apêndice L. Concentração dos inseticidas nas 147 amostras analisadas.	107

LISTA DE ABREVIATURAS

3-PBA: Ácido 3-fenoxi-benzóico (do inglês “*3-Phenoxybenzoic acid*”)

ACN: Acetonitrila

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI: Ionização química a pressão atmosférica (do inglês “*Atmospheric pressure chemical ionization*”)

ARfD: Dose Aguda de Referência (do inglês “*Acute reference doses*”)

a_w : Atividade de água (do inglês “*Water activity*”)

BIF: *cis*-bifentrina

CEE: Comunidade Econômica Europeia

CIA: Cialotrina

CIP: Cipermetrina

CLO: Clorpirifós

CS: Coreoatetose com salivação

DAD: Detector de arranjo de diodos (do inglês “*Diode Array Detector*”)

DEL: Deltametrina

DDT: Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DPR: Desvio padrão relativo

EC: Comissão Europeia - Saúde e da Segurança Alimentar (do inglês “*European Commission - Health and Food Safety*”)

ECD: Detector de captura de elétrons (do inglês “*electron capture detector*”)

EI: Ionização por impacto eletrônico (do inglês “*Electron Ionization*”)

EID: Estimativa de ingesta diária

ELL: Extração Líquido-Líquido

ESI: Ionização por “electrospray” (do inglês “*electrospray ionisation*”)

EPA-US: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês “*United States Environmental Protection Agency*”)

EAU: Extração assistida por ultrassom

FAO: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (do inglês “*Food and Agriculture Organization of the United Nations*”)

FI: Fator isomérico

FQPA: Lei de proteção da qualidade dos alimentos (do inglês “*Food Quality Protection Act*”)

GABA: Ácido gama-aminobutírico (do inglês “*Gamma-Amino Butyric Acid*”)

GC: Cromatografia a gás (do inglês “*Gas Chromatography*”)

GC-ECD: Cromatografia a gás com detector de captura de elétrons (do inglês “*Gas Chromatography- electron capture detector*”)

GC-MS: Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa (do inglês “*gas chromatography-mass spectrometry*”)

GC-MS/MS: Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa em *tandem* (do inglês “*gas chromatography tandem-mass spectrometry*”)

GC/NCI-MS/MS: Cromatografia a gás com ionização química no modo negativo acoplada a espectrometria de massa em *tandem* (do inglês “*gas chromatography negative chemical ionization tandem-mass spectrometry*”)

IARC: Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (do inglês “*International Agency for Research on Cancer*”)

IDA: Ingesta Diária Aceitável

IN: Instrução Normativa

JECFA: Comitê de especialistas em aditivos alimentares (do inglês “*Joint Expert Committee on Food Additives*”)

JFCRF: Fundação de pesquisa japonesa de produtos químicos em alimentos (do inglês “*The Japan Food Chemical Research Foundation*”)

JMPR: Reunião Conjunta sobre Resíduos de Pesticidas (do inglês “*Joint Meeting on Pesticides Residues*”)

LANAGRO-RS: Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul

LC: Cromatografia a líquido (do inglês “*Liquid chromatography*”)

LC-MS: Cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massa (do inglês “*Liquid chromatography-mass spectrometry*”)

LC-MS/MS: Cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massa em *tandem* (do inglês “*Liquid chromatography tandem-mass spectrometry*”)

LD: Limite de detecção

LMRs: Limite Máximo de Resíduos

LQ: Limite de quantificação

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Mercosul: Mercado Comum do Sul

MGK-264: N-octyl bicycloheptene dicarboximide

MRM: Monitoramento de reações múltiplas (do inglês “*Multiple Reaction Monitoring*”)

MSPD: Dispersão da matriz em fase sólida (do inglês “*matrix solid phase dispersion*”)

NCI: Ionização química no modo negativo (do inglês “*Negative Chemical Ionization*”)

NOEC: Concentração máxima para nenhum efeito observado (do inglês “*No Observed Effect Concentration*”)

PER: Permetrina

PNCRC/Animal: Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal

PSA: Aminas primária e secundária (do inglês “*Primary Secondary Amine*”)

QuEChERS: Método de extração (do inglês “*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*”)

SIM: Monitoramento de íon selecionado (do inglês “*Selected Ion Monitoring*”)

SPE: Extração em fase sólida (do inglês “*Solid Phase Extraction*”)

SPME: Micro extração em fase sólida (do inglês “*Solid Phase Micro Extration*”)

TCP: 3,5,6-tricloro-2-piridinol

TIC: Cromatograma de íons totais (do inglês “*Total Ion Chromatogram*”)

WHO: Organização Mundial da Saúde (do inglês “*World Health Organization*”)

RESUMO

O uso de inseticidas piretróides na agricultura, pecuária e em áreas urbanas pode gerar problemas à saúde dos seres humanos e dos animais. O controle destes inseticidas nos alimentos é uma importante ferramenta para avaliar o risco da exposição a estes compostos. Em vista disso, este estudo tem por objetivo desenvolver um método analítico eficiente, sensível e confiável para o preparo das amostras e quantificação de ultra traços de 17 piretróides e um organofosforado, o clorpirifós, utilizando padrões marcados além de realizar uma discussão sobre a incidência destes inseticidas. Os alimentos de origem animal selecionados para este estudo são: músculo bovino, peixe e de frango, leite e ovos. São alimentos ricos em gordura, devido a isso, são candidatos a estarem contaminados com estes inseticidas que apresentam propriedades lipofílicas.

O preparo da amostra consistiu na liofilização, extração assistida por ultrassom com solvente orgânico e *clean up* utilizando cartuchos de SPE com fases C18 e alumina básica. A técnica instrumental utilizada foi a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa no modo *tandem* utilizando ionização química no modo negativo (GC/NCI-MS/MS). As recuperações obtidas foram entre 50 e 120% para a maioria dos inseticidas com uma média de desvio padrão relativa abaixo de 10%. Na análise do perfil isomérico dos resultados de recuperação houve predominância dos isômeros na forma *cis* perante a *trans*. No quesito sensibilidade, os limites de detecção atingiram valores de 0,06 a 101 ng kg⁻¹.

O método desenvolvido foi utilizado para analisar 152 amostras, sendo que destas, apenas 4 não apresentaram nível de contaminação por inseticidas piretróides ou clorpirifós. A maioria estava contaminada com pelo menos 2 a 3 destes inseticidas. Os inseticidas detectados foram a bifentrina, cipermetrina, cialotrina, permetrina, deltametrina e o clorpirifós. Cabe ressaltar que apenas uma amostra de leite estava contaminada com níveis de clorpirifós acima do permitido. Na estimativa da ingestão diária, nenhum dos inseticidas ultrapassou os limites de segurança aceitáveis. Houve um maior nível de correlação entre a quantidade de inseticida e o teor de lipídios nas amostras de músculo bovino, de peixe e de frango. Nas amostras segregadas de ovos, os inseticidas estavam concentrados na gema. Os fatores isoméricos calculados nas amostras positivas apresentaram valores diferentes dos fatores isoméricos dos padrões e dos produtos comerciais. Houve uma predominância dos isômeros *cis* para a cipermetrina e um predomínio do segundo isômero (λ -cialotrina), no caso da cialotrina.

ABSTRACT

The use of pyrethroid insecticides in agriculture, livestock and in urban areas can lead to problems for the health of humans and animals. The control of these insecticides in food is an important tool to control the risk of exposure to these compounds. Therefore, the objective of this study was to develop an efficient, sensitive and reliable analytical method to promote the sample preparation and analysis of 17 pyrethroids and one organophosphorus, chlorpyrifos, using labelled standards and to discuss the incidence of these insecticides. The foods selected for this study are of animal origin, they are beef, fish, chicken, milk and eggs. They are foods rich in fat, in view of that, are candidates to be contaminated with these insecticides that have lipophilic properties.

The proposed sample preparation method was based on freeze-dried samples, solvent extraction and clean up using SPE cartridges with C18 and basic alumina phases. The instrumental technique used was gas chromatography coupled to mass spectrometry in tandem, with negative chemical ionization (GC/NCI-MS/MS). Recoveries in the range of 50 and 120% were obtained with a mean relative standard deviation below 10%. In the analysis of the isomeric profile of the recovery results there was predominance of the isomers in the form *cis*. In the sensitivity question, detection limits reached values of 0.06 to 101 ng kg⁻¹.

The method developed was used to analyze 152 samples, of which only 4 did not present any level of contamination with pyrethroids or chlorpyrifos insecticides. Most were contaminated with at least 2 to 3 of these insecticides. The insecticides detected were bifenthrin, cypermethrin, cyhalothrin, permethrin, deltamethrin and chlorpyrifos. It is important to mention that only one milk sample was contaminated with chlorpyrifos levels above that allowed. In the estimation of daily intake, none of the insecticides exceeded the safety limits of acceptable daily intake. There was a strong correlation between the amount of insecticide and the lipid content in bovine muscle, fish and chicken samples. In the eggs segregated samples the insecticides were concentrated in the yolk. The calculated isomeric factors in the positive samples presented different values of the isomeric factors of the commercial products and standard. There was a predominance of the *cis* isomers for cypermethrin and a predominance of the second (λ -cyhalothrin) isomer in the case of cyhalothrin.

1 INTRODUÇÃO

O crescimento contínuo da população mundial tem elevado a demanda por alimentos. Neste sentido, nos últimos anos, o setor agrícola brasileiro vem buscando o aumento da produção de alimentos, visando atender aos mercados externos e internos. Na busca de sistemas agrícolas mais eficientes, o uso de agrotóxicos para o controle de pragas e doenças tem se intensificado¹. O mercado de consumo de agrotóxicos, a nível mundial, cresce a taxas superiores a 5% em países em desenvolvimento como o Brasil, onde este crescimento é mais acelerado². Segundo o Ministério do Meio Ambiente, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo³, tendo comercializado 478.000 toneladas de princípios ativos no ano de 2012⁴.

Os agrotóxicos são compostos químicos empregados amplamente na prática agrícola, na produção, na colheita, e no armazenamento de alimentos⁵. A classe mais antiga de agrotóxicos inclui os compostos organoclorados, cujo uso foi restringido devido a persistência ambiental e o potencial risco sobre a saúde humana⁶. Desde então, os organoclorados começaram a ser substituídos por outras gerações de agrotóxicos, que compreendem: os organofosforados, os carbamatos e os piretróides, visto que, possuem alto poder de ação e são menos persistentes no meio ambiente⁷. O combate às pragas na agricultura se dá, principalmente, através da utilização de agrotóxicos com ações fungicidas, herbicidas e inseticidas. Contudo, a aplicação de agrotóxicos pode provocar a contaminação de cursos de água, do solo, do ar e em alimentos de origem vegetal e animal. Estes agrotóxicos podem ser transferidos das plantas, sementes e águas para os animais via cadeia alimentar. Além disso, no caso dos animais que serão utilizados para gerar alimentos, é comum a utilização de inseticidas por aplicação direta para o controle de pragas. Conseqüentemente, animais do setor agropecuário são alvos diretos e indiretos dos agrotóxicos, podendo acumular resíduos na gordura, nos tecidos e também eliminar no leite⁸.

Destes agrotóxicos, os de ação inseticida tem notoriedade sendo largamente utilizados em áreas agrícolas e urbanas, sendo a classe dos inseticidas piretróides um destaque nesta prática. A presença destes compostos no ambiente e na cadeia alimentar pode causar sérios riscos à saúde humana, uma vez que a contaminação pode ocorrer através das vias respiratória e dérmica, mucosas e pelo trato gastrointestinal⁹. Devido à ampla utilização, mesmo sendo considerados de rápida degradação no ambiente, os piretróides estão presentes na água¹⁰, em alimentos de origem vegetal¹¹ e animal¹² podendo ser encontrados inclusive no

leite materno¹³. Segundo a Organização Mundial da Saúde, os governos tem a responsabilidade de regular a produção, a distribuição e a utilização dos agrotóxicos em seus países, garantindo a alocação de recursos adequados¹⁴.

Com base no que foi exposto, é de suma importância a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Os estudos publicados, no cenário nacional, nos últimos 10 anos, mostram as diversas classes de agrotóxicos presentes em alimentos de origem vegetal e animal. A **Figura 1**, mostra uma pesquisa realizada na base de dados do *web of knowledge*¹⁵ com os termos “*pesticides*” e “*food*” e restringindo o país de origem “Brasil” e considerando apenas os agrotóxicos que estavam presentes, não foi levado em consideração a frequência de aparecimento ou a quantidade encontrada⁽¹⁶⁻²⁹⁾.

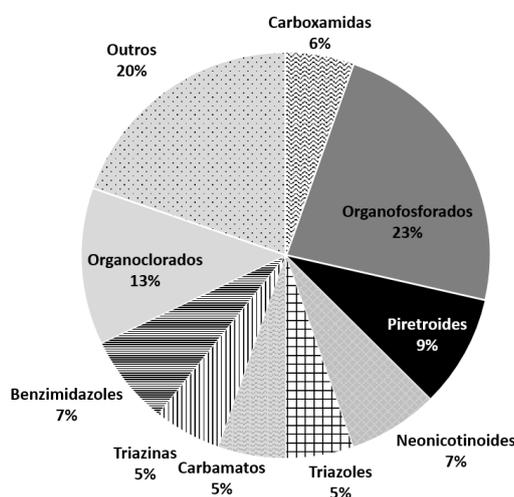


Figura 1. Classes de agrotóxicos encontrados em alimentos de origem vegetal e animal, no Brasil⁽¹⁶⁻²⁹⁾.

As classes de maior incidência nos alimentos foram os organofosforados, os organoclorados e os piretróides com percentuais de 23%, 13% e 9%, respectivamente. Destes estudos, apenas 29% foram realizados em alimentos de origem animal. É sabido que matrizes de origem animal são complexas, pois apresentam grande quantidade de proteínas e gorduras e desta forma, a detecção e quantificação dos agrotóxicos nestas matrizes não é uma tarefa simples. Outra dificuldade encontrada está na concentração destes agrotóxicos nos alimentos, normalmente, presentes em níveis de ultra traços. A detecção e quantificação dos resíduos de agrotóxicos em alimentos ocorre principalmente via cromatografia a gás ou líquida acopladas a espectrometria de massa. Essas técnicas instrumentais apresentam sensibilidade e especificidade suficientes para determinações em níveis de ultra traços.

2 JUSTIFICATIVA

Os alimentos de origem animal como músculo bovino, músculo de peixe, músculo de frango, leite e ovos são amplamente consumidos pela população brasileira. Estes alimentos são ricos em gorduras, o que os torna suscetíveis a contaminação com resíduos de piretróides, visto que estes apresentam características lipofílicas. Pouco se sabe sobre a presença de ultra traços de resíduos destes inseticidas em alimentos de origem animal. Geralmente são avaliados pelos órgãos de fiscalização apenas no que tange os limites máximos de resíduos permitidos. A complexidade destas matrizes aliado as características estruturais destes compostos dificultam as análises de ultra traços. Desta forma, este trabalho busca ir além desses limites, propondo uma metodologia sensível para atingir baixos limites de detecção, assim, avaliar a incidência destes inseticidas em alimentos de origem animal, largamente consumidos pela população.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método analítico para preparo de amostras e posterior quantificação de inseticidas por GC/NCI-MS/MS e avaliar a incidência destes inseticidas em produtos de origem animal produzidos no Brasil e controlados pelo Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO-RS).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver metodologia analítica para a determinação dos piretróides (aletrina, bifentrina, ciflutrina, cialotrina, cipermetrina, deltametrina, fenvalerato, flumetrina, fluvalinato, imiprotrina, kadetrina, permetrina, fenotrina, praletrina, resmetrina, tetrametrina, e a transflutrina) e do organofosforado clorpirifós em músculo bovino, de peixe, de frango, leite e ovos via GC/NCI-MS/MS utilizando padrões marcados;
- Validar a metodologia desenvolvida através de ensaios de recuperação, determinação da precisão intermediária, faixa linear de trabalho e limites de detecção e quantificação;
- Analisar amostras de músculo bovino, de frango, de peixe, leite e ovos;
- Analisar de forma separada a clara e a gema nas amostras de ovos;
- Determinar o teor de gordura nas amostras e correlacionar com a quantidade de inseticidas nas amostras;
- Avaliar e comparar o perfil isomérico nos testes de recuperação, nas amostras analisadas e nos produtos comerciais;
- Comparar os resultados obtidos com a legislação vigente;
- Estimar a ingestão diária destes inseticidas com base nos valores encontrados nas amostras.
- Aplicar cipermetrina em uma vaca leiteira a fim de verificar a cinética de sua eliminação no leite utilizando o método desenvolvido.

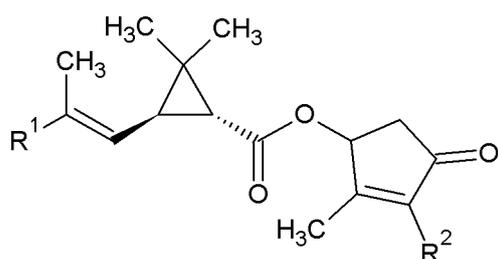
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 INSETICIDAS PIRETRÓIDES

As quatro classes de agrotóxicos mais utilizadas como inseticidas são os carbamatos, organofosforados, organoclorados e os piretróides. Em 2009, cerca de 20% de todos inseticidas utilizados no mundo eram piretróides³⁰. Dentre estas classes os piretróides apresentam menor toxicidade aos mamíferos, assim como maior potencial no combate aos insetos, sendo assim, mais seletivos em sua ação³¹. Porém, a história tem mostrado que nenhum agrotóxico é completamente seguro. Por exemplo, o Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT) foi muito utilizado na segunda metade do século XX e dito seguro dentro das normas estabelecidas. No Brasil, sua proibição parcial se deu entre 1985 e 1998 e total em 2009 pela Lei 11.936/09 em vista de sua alta toxicidade e persistência no ambiente. Em substituição aos organoclorados, os inseticidas organofosforados e carbamatos ganharam destaque e atualmente os piretróides são largamente utilizados por serem supostamente mais seguros. Em geral, a relação entre a toxicidade nos insetos (tópica) e a toxicidade aos mamíferos (oral) é muito mais elevada quando comparada a outros inseticidas³².

4.1.1 Origem e evolução dos piretróides

Os primeiros usos destes inseticidas datam por volta de 1840 na região de Dalmácia (atualmente abrange territórios da Croácia, Bósnia e Herzegovina e Montenegro), onde um preparado de flores secas de *Chrysanthemum cinerariifolium* e *Chrysanthemum coccineum*, originárias desta região, foi utilizado no combate de mosquitos. Hermann Staudinger e Lavoslav Ružička em 1924 descreveram as primeiras estruturas químicas envolvidas na ação inseticida dos extratos dessas flores, estruturas nomeadas de piretrinas. Porém, estes extratos oxidavam-se rapidamente tornando-se inativos e perdiam atividade quando expostos a luz e ao calor, desta forma, seu uso se dava quase que, exclusivamente, no interior das residências. O descobrimento das estruturas das piretrinas abriu espaço para o desenvolvimento de equivalentes sintéticos, nomeados de piretróides³⁰. Na **Figura 2** tem-se a estrutura básica de algumas piretrinas naturais.



Composto	R ¹	R ²
Piretrina I	-CH ₃	-CH ₂ -CH=CH-CH=CH ₂
Piretrina II	-COOCH ₃	-CH ₂ -CH=CH-CH=CH ₂
Cinerina I	-CH ₃	-CH ₂ -CH=CH-CH ₃
Cinerina II	-COOCH ₃	-CH ₂ -CH=CH-CH ₃
Jasmolina I	-CH ₃	-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH ₃
Jasmolina II	-COOCH ₃	-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH ₃

Figura 2. Estrutura básica das piretrinas naturais.

O primeiro piretróide sintetizado foi a aletrina em 1949 por LaForge e colaboradores³³, com estrutura muito similar a cinerina I. Em seguida surgiram outros como: fenotrina, praletrina, resmetrina, imiprotrina. Por volta da década de 70, alguns piretróides sintetizados apresentaram fotoestabilidade, abrindo desta maneira, a possibilidade de sua utilização em ambientes externos como na agricultura, pecuária e saúde pública³⁰.

O desenvolvimento dos piretróides pode ser dividido em dois grupos principais com base na ausência (tipo I) ou presença (tipo II) de um grupo ciano ligado ao carbono alfa da molécula. A cipermetrina é um exemplo de piretróide do tipo II (**Figura 3**).

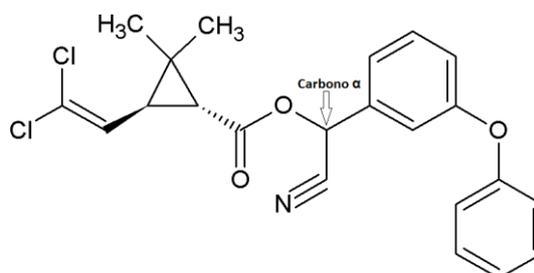


Figura 3. Estrutura química da cipermetrina, piretróide do tipo II.

4.1.2 Propriedades físico-químicas

Os piretróides são compostos lipofílicos, apresentam altos valores de coeficiente de partição (octanol-água) em torno de 5,7. Também apresentam baixa volatilidade, com pressão de vapor que variam de $1,8 \times 10^{-4}$ mm de Hg a 25 °C para bifentrina e até $3,6 \times 10^{-11}$ mm de Hg a 25 °C para tralometrina e baixa solubilidade em água. Por exemplo, a ciflutrina, cialotrina e a cipermetrina apresentam valores de solubilidade de 2, 3 e 4 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente³⁴.

Muitos dos piretróides se apresentam como uma mistura complexa de isômeros com dois ou mais carbonos assimétricos. Dentre estes, é possível citar a bifentrina e a ciflutrina com dois e três carbonos assimétricos, respectivamente (**Figura 4**).

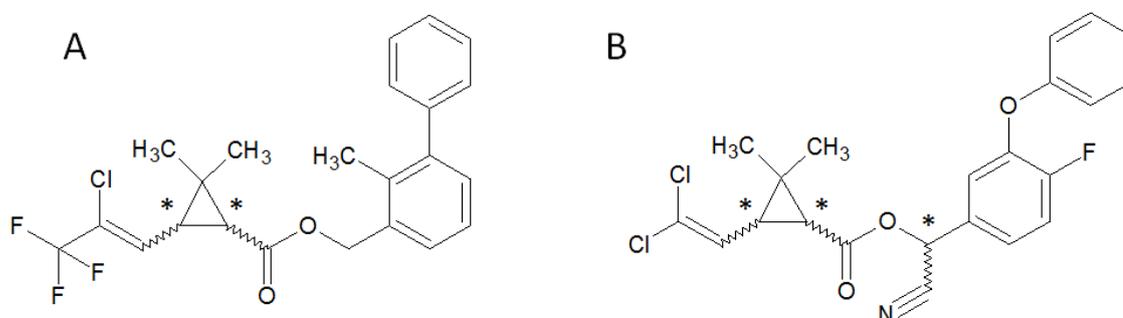


Figura 4. Estrutura química da bifentrina com dois centros quirais (A) e da ciflutrina que apresenta três centros quirais (B).

Dentre os agrotóxicos, os piretróides figuram entre as classes com maior número de centros quirais. Sua composição isomérica pode ser um importante parâmetro toxicológico, pois normalmente a atividade e o destino podem diferir de acordo com o isômero observado^{12; 35}. Desta forma, o monitoramento da distribuição isomérica se torna importante. Fatores como pH, solventes e a incidência de luz podem afetar a estabilidade dos piretróides³⁴.

4.1.3 Utilização

Os piretróides são utilizados em ambientes domésticos, comerciais, industriais, agrícolas, veterinário, área médica e saúde pública. Na área agrícola, sua utilização se dá, principalmente, no controle de insetos (principalmente pulgões e carunchos) em plantações e no armazenamento de grãos. No uso doméstico, o combate visa eliminar as baratas, mosquitos e formigas. Na veterinária, se utiliza no controle de ectoparasitas, como por exemplo, carrapatos e pulgas, na medicina humana no controle de ectoparasitas como os piolhos, e na saúde pública no combate aos vetores de algumas doenças como dengue e malária^{36; 37}.

Os piretróides normalmente são comercializados como uma mistura de isômeros. Porém, cabe salientar que alguns piretróides como a bifentrina, cialotrina e deltametrina apresentam isômeros específicos mais potentes, como a *cis*-bifentrina, a λ -cialotrina e a *cis*-deltametrina. Nestes casos, as formulações comerciais são enriquecidas com estes isômeros.

Algumas formulações fazem uso de agentes sinérgicos como o butóxido de piperonilo e o MGK-264 (N-octil bicicloheptano dicarboximida) a fim de aumentar a eficácia do piretróide³⁸. Também é comum encontrar os piretróides associados a inseticidas de outras classes. A associação entre a cipermetrina e o clorpirifós (organofosforado) é um exemplo. Estas associações são formuladas com o intuito de aumentar o espectro de ação, principalmente devido a resistência genética da praga frente ao piretróide. Um exemplo da utilização da associação citada é no combate a populações de carrapatos bovinos *Boophilus microplus* resistentes³⁹.

4.1.4 Diretrizes de uso

Os piretróides são utilizados como agrotóxicos e como medicamentos de uso humano e veterinário. A crescente popularidade dos piretróides levou a um aumento do risco de transferência dos resíduos para o ecossistema, através da cadeia alimentar e via resíduos na água, frutas e vegetais. Consequentemente, para proteger a saúde dos consumidores, foram estabelecidos limites máximos de resíduos (LMRs), que significa a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico/medicamento veterinário que pode estar presente naquele alimento seguindo as boas práticas agrícolas/boas práticas de uso de medicamentos veterinários⁴⁰. Os LMRs estão definidos para uma ampla gama de produtos alimentares de origem vegetal e animal e geralmente, se aplicam ao produto *in natura*.

Uma das primeiras normas a abordar os piretróides (no caso as piretrinas) como contaminantes em alimentos (cereais destinados ao consumo animal) foi a a *Directiva* 86/362/CEE⁴¹, propondo um LMR de 3 mg kg⁻¹ para o somatório das piretrinas. Já em produtos de origem animal, uma das primeiras normas foi a *Directiva* 86/363/CEE⁴², que propôs a fixação de alguns LMRs para agrotóxicos. Na Europa, os primeiros LMRs de piretróides em alimentos de origem animal foram determinados pelos *Regulamentos* 396/2005⁴³, 149/2008⁴⁴ e 839/2008⁴⁵, como por exemplo: bifentrina (músculo bovino, leite e ovos 0,05 mg kg⁻¹), ciflutrina (leite e ovos 0,05 mg kg⁻¹), cipermetrina (músculo bovino e frango 0,2 mg kg⁻¹, leite 0,05 mg kg⁻¹ e ovos 0,01 mg kg⁻¹), deltametrina (leite e ovos 0,1 mg kg⁻¹), λ-cialotrina (músculo bovino 0,5 mg kg⁻¹, leite 0,05 mg kg⁻¹ e ovos 0,02 mg kg⁻¹). Estes níveis não são fixados apenas nos limiares toxicológicos, são derivados de uma avaliação exaustiva das propriedades de cada substância ativa assim como seu comportamento nas culturas tratadas. Os LMRs são determinados com base no risco tóxico dos compostos,

quantidades passíveis de estarem presentes e os métodos analíticos propostos para efeitos de controle e monitoração⁴⁰.

Na avaliação de risco destacam-se os valores de Ingesta Diária Aceitável (IDA), para o risco crônico, que significa a quantidade máxima de agrotóxico que um indivíduo pode ingerir diariamente sem que sofra danos à saúde, durante toda vida. Destaque também para a Dose Aguda de Referência (ARfD), que está relacionada a quantidade de agrotóxico que pode ser consumida em uma refeição ou em um dia sem ocasionar danos à saúde⁴⁶.

Como referências internacionais para determinação desses limites destacam-se: o *CÓDEX Alimentarius*⁴⁷ que recebe assessoramento do JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives*) e do JMPR (*Joint Meeting on Pesticides Residues*) ambos formados por especialistas da FAO/WHO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*)/(World Health Organization); a Comissão Europeia (EC)-(European Commission - Health and Food Safety)⁴⁸; a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA-US)-(United States Environmental Protection Agency)⁴⁹; a Fundação de Pesquisa Japonesa de Resíduos Químicos em Alimentos (JFCRF)-(The Japan Food Chemical Research Foundation)⁵⁰.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é responsável pelo controle dos resíduos destes inseticidas nos alimentos de origem animal. Este controle é realizado através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC/Animal). O objetivo do PNCRC/Animal é promover a garantia da qualidade dos produtos envolvidos ao longo de toda cadeia produtiva dos alimentos de origem animal. As análises destas amostras são realizadas nos Laboratórios Nacionais Agropecuários (LANAGROS) e laboratórios privados/públicos credenciados ao MAPA⁵¹. Para 2017 os LMRs estão definidos pela instrução normativa do do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (IN-09 PNCRC 2017)⁵².

No **Apêndice A** (página 80) estão apresentados os LMRs dos principais piretróides: bifentrina, ciflutrina, cialotrina, cipermetrina, deltametrina, permetrina, fenvalerato e do organofosforado clorpirifós definidos pela EC, EPA-US, pelo *CÓDEX Alimentarius*, pela JFCRF e pela IN-09 PNCRC/animal 2017. Nos peixes, apenas a IN-09 PNCRC 2017, a JFCRF e a EPA-US apresentam alguns valores de LMRs para piretróides e clorpirifós.

Na IN-09 do PNCRC 2017 estão incluídos 10 piretróides (aletrina, bifentrina, ciflutrina, cipermetrina, deltametrina, fempropatrina, fenvalerato, λ-cialotrina, permetrina,

prometrina) para análise em um mínimo de 45 amostras de ovos, 30 de músculo de peixes, 45 de leite, 140 de músculo bovino e 45 de frango, entre outros produtos de origem animal, por exemplo o mel.

Os produtos comerciais contendo piretróides e/ou clorpirifós destinados a agricultura ou a medicina veterinária estão registrados na ANVISA ou no MAPA. Na **Tabela 1** é possível observar o número de produtos comerciais que contém os ativos avaliados neste trabalho, as bases para preencher a tabela foram o banco de informações sobre os agrotóxicos e afins registrados no Ministério da Agricultura (agrofit)⁵³ e o portal de conteúdo agropecuário agrolink⁵⁴. O agrolink está dividido em duas áreas: uma voltada para a agricultura (Agrolink Fito) e a outra voltada para a saúde animal (Agrolink Veterinária).

Tabela 1. Número de produtos comerciais registrados para utilização na agricultura e medicina veterinária nas bases do agrofit e agrolink.

	Agrofit	Agrolink Fito	Agrolink Veterinária
Clorpirifós	19	19	38
Cipermetrina	19	32	110
λ -Cialotrina	20	10	-
Deltametrina	7	7	12
Bifentrina	24	26	-
Permetrina	13	13	31

Dos 38 produtos contendo o ativo clorpirifós informado pelo agrolink-veterinária⁵⁵, 25 estão em associação com o ativo cipermetrina. Nenhum dos 19 produtos contendo o ativo clorpirifós informado pelo agrolink-fito⁵⁶ ou agrofit⁵³ estavam associados a cipermetrina.

No que tange o comércio internacional de alimentos, os valores de LMRs controlam e limitam este comércio através dos LMRs do país importador. Na comunidade europeia, a igualdade nas condições de concorrência e a circulação interna de mercadorias, foi facilitada devido ao regulamento 396/2005 do parlamento europeu⁴³. Este regulamento trata da utilização de um valor padrão de LMRs entre os países membros. O valor é estabelecido comunitariamente, visando um elevado nível de proteção aos consumidores e levando em consideração as boas práticas agrícolas. Nesta mesma linha o MAPA e ANVISA já realizaram uma consulta pública (Consulta Pública 57/2015) de um texto redigido de forma conjunta para facilitar o comércio de produtos vegetais *in natura* entre os países do Mercado Comum do Sul-Mercosul.

4.1.5 Toxicologia

Os piretróides são um grupo de inseticidas com ação neurotóxica nos insetos. O seu mecanismo está baseado na interferência da geração e propagação dos impulsos elétricos, alteram o funcionamento dos canais de sódio voltagem dependentes, o que produz vários pulsos elétricos produzindo uma paralisia total no inseto⁵⁷. A potência da ação inseticida, na maioria dos casos, é dependente da configuração isomérica. Não apenas entre os diastereoisômeros, como ocorre com a bifentrina, onde apenas o isômero *cis* apresenta atividade inseticida, mas também entre os enantiômeros, principalmente no carbono quiral adjacente ao grupo carboxílico. Por exemplo a configuração R neste carbono da permetrina é cerca de 25 vezes mais potente do que a configuração S no combate a moscas domésticas⁵⁷.

A ação inseticida dos piretróides é altamente eficiente. O problema começa quando temos ação em seres vivos não alvos. Peixes e invertebrados aquáticos são extremamente sensíveis a estes inseticidas^{58; 59}. Testes avaliando a toxicidade crônica em peixes resultaram em valores de concentração máxima para nenhum efeito observado (NOEC) de 30 ng L⁻¹ e 12 ng L⁻¹ para a cipermetrina e bifentrina, respectivamente⁶⁰. As abelhas também são suscetíveis a estes inseticidas, apresentando uma menor quantidade de enzimas capazes de biotransformar os piretróides⁶¹.

Em 1996, nos Estados Unidos, a lei de proteção da qualidade dos alimentos (FQPA) elencou os piretróides como suspeitos de risco cumulativo e de compartilhar mecanismos comuns de neurotoxicidade⁶². Em mamíferos como os ratos, os piretróides apresentam uma toxicidade aguda moderada. A ação tóxica nos mamíferos pode estar relacionada a quatro sítios de interação com os piretróides. A ação tóxica *in vitro* ocorre nos canais de sódio e cálcio voltagem dependentes, nos canais de cloreto voltagem e ligante dependentes e nos receptores Ácido gama-aminobutírico - A (GABA_A). Destes sítios, apenas os canais de sódio, cálcio e cloreto sofrem ação dos piretróides em baixa concentração implicando em uma ação neurotóxica⁶³. Os piretróides apresentam um baixo potencial de ação nos receptores GABA_A, porém há evidências bioquímicas indicando que piretróides do tipo II ligam e bloqueiam os receptores GABA em cérebros de mamíferos⁵⁷.

A principal ação neurotóxica que ocorre nos mamíferos assim como nos insetos é a ação sobre os canais de sódio voltagem dependentes. Geralmente, nos mamíferos, os piretróides do tipo I induzem potenciais de ação repetitivos nos axônios em resposta a uma única despolarização elétrica, possivelmente provocando tremores (sintoma comum na intoxicação por piretróides em mamíferos). Já os do tipo II produzem correntes de longa

duração que causam despolarização extensiva do potencial de membrana em repouso bloqueando a condução nervosa, o sintoma mais comum é a coreoatetose¹ com salivação (CS)⁶³. Porém, alguns piretróides geram ambos os sintomas. Já no contato dérmico a estes inseticidas o principal sintoma apresentado é a parestesia, caracterizada por dormência, prurido, queimação ou formigamento³⁰. A toxicidade aguda em mamíferos está resumida na **Tabela 2**, onde estão apresentados apenas os piretróides que apresentaram resultados positivos nas amostras analisadas neste trabalho.

Tabela 2. Toxicidade aguda oral em ratos e níveis de toxicidade para humanos dos piretróides do tipo I e II.

Piretróide	Grupo ciano	Toxicidade aguda oral LD ₅₀ (mg kg ⁻¹)	Nível de toxicidade (WHO/EPA)
Cipermetrina	+	287	(II) Moderada
λ-Cialotrina	+	56	(II) Moderada
Deltametrina	+	87	(II) Moderada
Bifentrina	-	54	(II) Moderada
Permetrina	-	>430	(II/III) Leve a Moderada

Além dos sintomas já mencionados, a ação tóxica dos piretróides, em humanos, também pode causar: disfunção endócrina^{64; 65; 66}, neurotoxicidade^{57; 67} e carcinogenicidade⁶⁸. Recentemente a agência internacional de pesquisa em câncer (IARC) colocou a permetrina na lista de revisões para o período de 2015 a 2019 com alta prioridade, dada a sua possibilidade de causar câncer⁶⁹.

Pouco se sabe sobre os efeitos crônicos causados pela exposição cumulativa a estes inseticidas, exposição que pode ser via inalatória, dérmica e oral incluindo os resíduos em alimentos e na água. O estabelecimento de um mecanismo comum de toxicidade em mamíferos não é um processo direto como nos casos dos organofosforados e carbamatos, visto que, os piretróides apresentam ação em vários sítios⁵⁷

¹ Coreoatetose - é a ocorrência de movimentos involuntários de contrações migratórias irregulares, torção e contorção.

4.1.5.1 Toxicocinética dos piretróides em mamíferos.

Nos mamíferos, os piretróides apresentam uma baixa absorção dérmica e quando administrados via oral na forma de suspensão aquosa são pouco absorvidos devido as características lipofílicas. Porém, se administrados via oral e concomitantemente a óleos vegetais, os piretróides são rapidamente e extensivamente absorvidos no trato gastrointestinal. Por consequência, o consumo de alimentos ricos em gorduras contaminadas com piretróides podem aumentar o risco aos humanos, pois a forma de administração afeta diretamente a taxa de absorção, formas mais lipofílicas aumentam esta taxa⁵⁷. Nos humanos, a absorção é semelhante, segundo Woollen e colaboradores⁷⁰ a cipermetrina apresentou uma absorção de aproximadamente de 36% pela via oral e 1,2% pela via cutânea. Porém Capt e colaboradores⁷¹ encontraram valores de 12% de absorção na via cutânea de ratos. Esta diferença entre as absorções cutâneas ocorre devido as diferentes enzimas envolvidas na biotransformação.

Em termos gerais os piretróides são biotransformados através de hidrólises, oxidações e conjugações. A biotransformação inicial do composto original ocorre pelo ataque de esterases na porção éster no centro da molécula. Essa clivagem separa a porção ácida e alcoólica dos piretróides (**Figura 5**), e pelo ataque de monoxigenases dependentes do Citocromo P 450 que está envolvido⁷². Após esta clivagem outras reações como as de oxidação e conjugação são comuns na biotransformação dos piretróides.

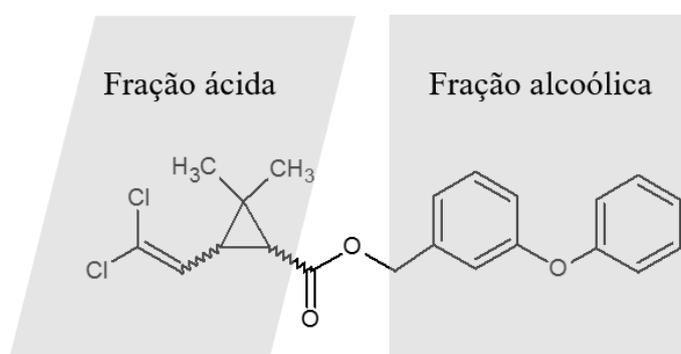


Figura 5. Piretróide permetrina com as frações ácida e alcoólica destacadas.

Por serem compostos lipofílicos, dificilmente os piretróides são eliminados na urina em sua forma original. Na **Figura 6**, estão apresentados alguns metabólitos dos piretróides. O metabólito mais comum que é eliminado na urina na forma livre, é o ácido 3-fenoxi-benzóico (3-PBA). Ele pode ser formado através da biotransformação dos seguintes piretróides: cipermetrina, cialotrina, deltametrina, permetrina, fempropatrina, fenotrima e esfenvalerato.

Estes metabólitos também podem ser eliminados na forma conjugada^{72; 73; 74}. No caso dos piretróides do tipo II (que contêm o grupo ciano) a perda do grupo ciano ocorre de forma não enzimática⁵⁷.

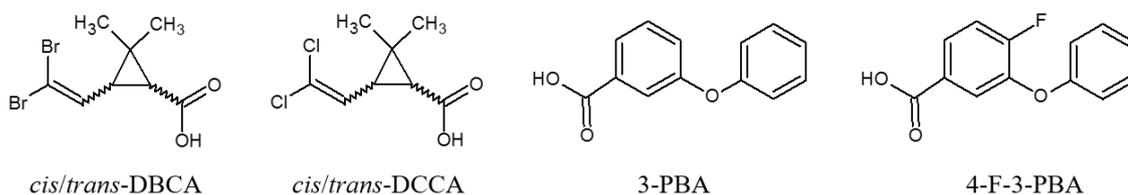


Figura 6. Metabólitos mais comuns provenientes dos piretróides (3-PBA ácido 3-fenoxi-benzóico; 4-F-3-PBA ácido 3-fenoxi 4-fluor-benzóico; DCCA 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetil-ciclopropano ácido carboxílico; DBCA 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetil-ciclopropano ácido carboxílico).

A biotransformação também pode ser enantioselectiva, sendo que em alguns casos a biotransformação da fração éster ocorre de forma mais intensa nos isômeros *trans*⁷⁵ (**Figura 7**).

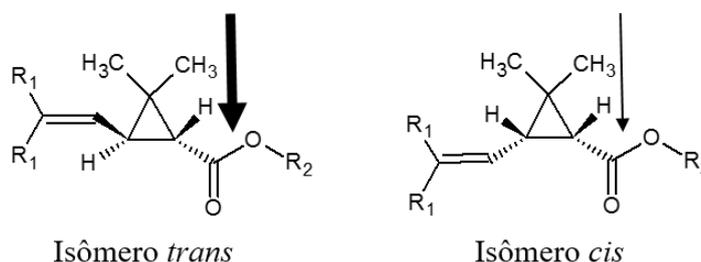


Figura 7. Isômeros *trans* e *cis* da fração ácida dos piretróides. Setas estão indicando a intensidade da biotransformação.

Além disso, de uma forma geral os isômeros *cis* são mais tóxicos que os correspondentes *trans*⁷⁶.

Gullick e colaboradores⁶² observaram a presença de piretróides no cérebro e no fígado de ratos tratados com piretróides. Esta presença no cérebro reforça a preocupação dos possíveis efeitos neurotóxicos dos piretróides.

Bruckner⁷⁷ relatou que há uma diferença fundamental na bioquímica de adultos em relação às crianças, principalmente nos sistemas nervoso, endócrino, reprodutivo, imunológico e visual. Isto pode tornar as crianças mais suscetíveis aos efeitos neurotóxicos dos piretróides, mesmo em níveis de exposição ambiental ou alimentar.

4.2 CLORPIRIFÓS

É um inseticida de amplo espectro da classe dos organofosforados (**Figura 8**), é largamente utilizado no controle de insetos na agricultura e na produção animal. Teve sua introdução no mercado em 1965, atualmente é registrado na maioria dos países. O baixo preço e a facilidade de acesso o torna um dos inseticidas mais utilizados, sendo sua produção e utilização aumentada drasticamente a cada ano. A produção de clorpirifós em 2015, na China, foi estimada em 200.000 toneladas⁷⁸. Apresenta propriedades físico-químicas como pressão de vapor de $7,5 \times 10^{-6}$ mm de Hg a 25 °C, solubilidade em água de 390 $\mu\text{g L}^{-1}$ e coeficiente de partição (octanol-água) de 5,0 demonstrando alta lipofilia^{79; 80}.

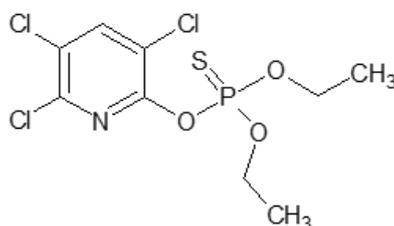


Figura 8. Estrutura química do organofosforado clorpirifós.

É um inseticida de fácil degradação o que contrapõe sua toxicidade. Diferentemente dos piretróides os produtos de degradação apresentam maior toxicidade ambiental do que o próprio clorpirifós. O CLO-oxon e 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) são exemplos destes produtos de degradação com maior toxicidade ambiental^{78; 81} (**Figura 9**).

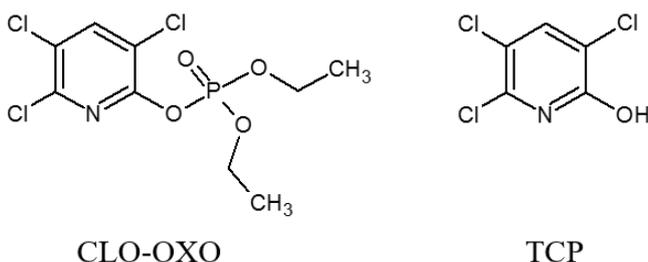


Figura 9. Estruturas dos produtos de degradação CLO-OXO e TCP oriundos do CLO.

O TCP também é o metabólito do clorpirifós mais excretado nos humanos, sendo utilizado como biomarcador no caso de exposição ao clorpirifós⁸². Liu e colaboradores⁸³ detectaram este metabólito na urina de 70% das crianças de regiões agrícolas da China, de um total de 364 crianças. É moderadamente tóxico aos humanos. Apresenta uma toxicidade aguda oral LD_{50} de 64 mg kg^{-1} em ratos e no ambiente apresenta alta toxicidade. Testes avaliando a toxicidade crônica em peixes resultaram em um *NOEC* de 140 ng L^{-1} ⁶⁰. Em humanos, os

indícios toxicológicos apontam para problemas como desregulação endócrina com efeitos estrogênicos⁸⁴ e anti-androgênicos⁸⁵, além de alterações na tireoide⁸⁶. Este organofosforado foi incluído no trabalho devido a sua associação com os piretróides para ampliar o espectro de ação sobre organismos resistentes.

4.3 ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL: MÚSCULO BOVINO, DE PEIXE, DE FRANGO, OVOS E LEITE.

Estes produtos fazem parte do setor primário da economia. No Brasil este setor representou 5,2% do produto interno bruto em 2015⁸⁷. O agronegócio, que abrange este setor assim como seu beneficiamento, representou mais de 40%, no quesito financeiro das exportações brasileiras nos anos de 2014 e 2015⁸⁸. Nos últimos anos, o Brasil se afirmou como um dos maiores produtores e exportadores mundiais de alimentos⁸⁹.

Nos alimentos de origem animal o Brasil tem o segundo maior rebanho bovino do mundo⁹⁰, atingindo um valor de aproximadamente 215 milhões de cabeças em 2015⁹¹, que corresponde mais de um animal por habitante, visto que a população era de aproximadamente 205 milhões em 2015⁹². A produção de frango também ocupa a segunda posição a nível mundial⁹³, já a produção de leite é a quinta maior do mundo⁹⁴. A produção de ovos no Brasil vem aumentando com o passar dos anos, em 2016, atingiu 3,1 bilhões de dúzias, que representou um crescimento de 53% quando comparado a produção de 2005⁹⁵. O pescado é outro alimento de origem animal que teve seu consumo e produção aumentados com o passar dos anos, atingindo valores de produção anual de aproximadamente 483 milhões de quilos no ano de 2015⁹¹. Todos estes alimentos de origem animal são de grande relevância na dieta dos brasileiros.

O Brasil se caracteriza por ter um setor primário muito forte, os números citados no parágrafo anterior reforçam isto. Porém, nos sistemas de produção empregados, existe uma forte correlação entre o uso de agrotóxicos/medicamentos veterinários com o aumento da produção. Colaborando com isso, o Brasil está entre os países que mais utilizam agrotóxicos no mundo³. Devido a esta grande produção de alimentos e alto consumo de agrotóxicos o controle da qualidade dos alimentos torna-se extremamente relevante. Para isso o monitoramento da presença de resíduos de agrotóxicos é essencial.

O consumo de carnes, leite e ovos é amplamente difundido em todo mundo. Muitos produtos químicos sintéticos, particularmente os agrotóxicos lipofílicos podem bioacumular nestas matrizes ou serem excretados no caso do leite. Resultando em exposição humana,

quando do consumo destes produtos. Estima-se que cerca de 95% da exposição humana a contaminantes lipofílicos se dê pelo consumo de produtos de origem animal^{96; 97}. Estudos demonstram que cerca de 90% da ingesta diária humana de agrotóxicos lipofílicos como organoclorados e bifenilas policloradas são oriundos de alimentos de origem animal ricos em gordura, como os bovinos, os peixes e os laticínios⁹⁸.

Os alimentos de origem animal como leite, ovos, músculo de bovino, de peixe e de frango são formados, principalmente por água, proteínas e lipídios (**Figura 10**). Os dados da **Figura 10** foram retirados da base de dados do departamento de agricultura dos Estados Unidos⁹⁹. Estes valores correspondem a um padrão de cada alimento. Existem variações de acordo com as diferentes espécies, porém, esses dados são interessantes para se ter uma ideia da composição de cada alimento.

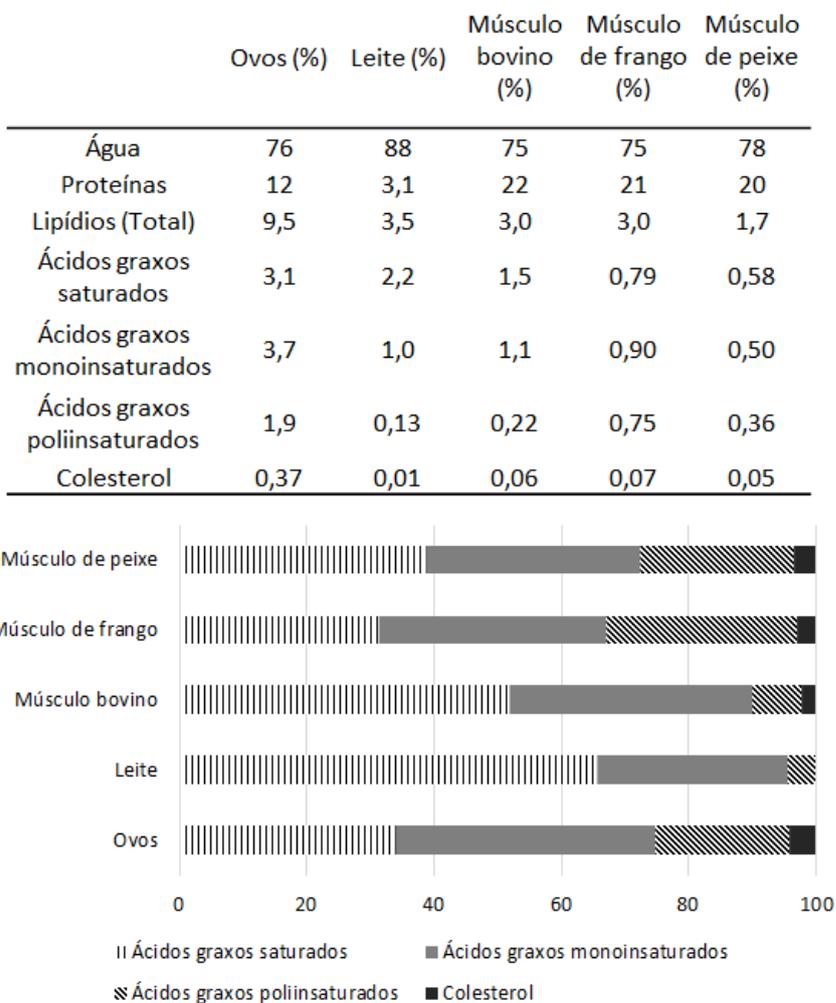


Figura 10. Caracterização das matrizes ovos, leite, músculo bovino, de frango e de peixe (% em peso úmido) e distribuição porcentual dos principais lipídios entre as matrizes.

De acordo com a natureza lipofílica desses alimentos e da natureza lipofílica dos inseticidas piretróides e do clorpirifós, estes alimentos são colocados como “sob suspeita” quanto à presença destes inseticidas.

4.3.1 Ovos de *Gallus gallus domesticus*

Os ovos constituem um componente importante na dieta humana. Eles são nutritivos, baratos e de fácil obtenção. Apresentam em sua composição proteínas e gorduras como principais constituintes além da água (**Figura 10**). O ovo pode ser separado facilmente em duas frações: clara e gema. A gema é a fração lipídica, constituída principalmente por ácidos graxos saturados e monoinsaturados (**Figura 10**), enquanto que a clara é a fração proteica, sendo a albumina a principal proteína. Caso a galinha tenha sido exposta a estes inseticidas no período de formação do ovo, este poderá conter resíduos dos inseticidas aplicados. Um exemplo é a aplicação de cipermetrina no combate ao cascudinho (*A. diaperinus*) e ao piolho (*Menacanthus stramineus*) em aviários para o controle dessas pragas.

4.3.2 Leite

Nos últimos anos, por diversas vezes, os problemas de qualidade do leite foram capa dos principais meios de comunicação, principalmente, devido à adulteração. O Estado do Rio Grande do Sul está entre os maiores produtores do Brasil. O leite é caracterizado como um alimento aquoso rico em proteínas e lipídios, principalmente, em ácidos graxos saturados (**Figura 10**). É um alimento produzido e secretado pelas glândulas mamárias dos animais leiteiros e, desta forma, a saúde desse animal é fundamental para a qualidade do leite. Este alimento pode sofrer contaminação por piretróides e clorpirifós de forma indireta, por meio da contaminação da pastagem, de rações e cereais, dá aplicação nos estábulos ou direta no animal, dentre outras. O piretróide cipermetrina é um exemplo da aplicação direta na parte externa do animal, muito utilizado no combate ao carrapato (*B. microplus*)¹⁰⁰. A contaminação do leite pode ser oriunda deste uso, uma vez que o inseticida pode passar pela barreira cutânea, atingindo o sangue e através das glândulas mamárias ser eliminado no leite. Principalmente, devido a presença de lipídios, já que os piretróides e o clorpirifós são de natureza lipofílica.

4.3.3 Músculo bovino e de frango

Músculo bovino e de frango, ambos oriundos de animais terrestres, apresentam em sua composição proteínas e gorduras como principais constituintes além da água (**Figura 10**). Os resíduos de piretróides e clorpirifós podem estar presentes devido a alimentação destes animais, assim como da aplicação direta no combate as pragas através da aplicação de produtos veterinários. Aplicação destes produtos em bovinos, na maioria das vezes, é de forma tópica através da pulverização ou *pour on*.

4.3.4 Peixe

Peixes apresentam em sua composição proteínas e gorduras como principais constituintes além da água (**Figura 10**). Muitos estudos tem relatado a contaminação por agrotóxicos em água doce e salgada. Esta contaminação é oriunda de uma diversidade de atividades antropogênica na agricultura e aquicultura, e se deve principalmente a utilização de agrotóxicos como organoclorados, carbamatos, organofosforados e piretróides no combate das mais variadas pragas. Os peixes presentes nestas áreas estão expostos a estes agrotóxicos e podem bioacumular estes contaminantes nos tecidos¹⁰¹. Um exemplo disto é a aplicação de deltametrina diretamente na água no combate ao piolho do mar *Caligus rogercresseyi*¹⁰².

4.4 METODOLOGIAS DE ANÁLISE PARA PIRETROIDES

Existem diversos métodos de extração e detecção, desenvolvidos por pesquisadores, para determinação de resíduos de piretróides em matrizes de origem animal. Geralmente apresentam duas etapas: o preparo de amostra baseado na extração e *clean up*; e análise instrumental baseada na cromatografia com diversos tipos de detectores. No **Apêndice B** (página 81) está apresentada uma breve revisão da literatura científica ressaltando a metodologia de extração/*clean up*, piretróides avaliados, tipos de matriz e instrumentação analítica. Cabe salientar, assim como já relatado por LeDoux e colaboradores¹⁰³, que a literatura ainda é escassa quando as matrizes trabalhadas são de origem animal.

4.4.1 Preparo de amostra

A grande complexidade das amostras de origem animal requerem sistemas de preparo de amostras eficientes a fim de eliminar interferentes sem perdas dos analitos de interesse, os quais, normalmente, estão presentes em baixas concentrações. Ou seja, manter altas taxas de recuperação não é uma tarefa fácil nestas amostras complexas. A grande

maioria das amostras de origem animal apresentam uma quantidade considerável de componentes com diferentes propriedades físicas e químicas, onde os principais macrocomponentes são a água, proteínas e lipídios¹⁰⁴.

A liofilização pode ser utilizada na remoção de água das matrizes de origem animal. Esta remoção ocorre via sublimação, uma vez que, a matriz é congelada e colocada sob vácuo, permitindo que o gelo mude diretamente para fase gasosa. O processo consiste em três etapas: congelamento, secagem primária (sublimação) e secagem secundária (dessorção). A principal vantagem na liofilização deste tipo de matriz está no aumento da estabilidade destas matrizes.

Outro componente a ser eliminado são os lipídios que contribuem adicionalmente para a complexidade das matrizes de origem animal. Eles são prejudiciais aos sistemas instrumentais utilizados, ocasionando problemas no sistema de injeção e na coluna cromatográfica¹⁰⁵. A dificuldade está em remover os lipídios sem carrear os analitos lipofílicos tais como os piretróides e o clorpirifós. Geralmente, os piretróides são extraídos, das matrizes biológicas através da utilização de solventes orgânicos. Além da extração, se faz necessária uma etapa de *clean up*. Esta etapa visa a remoção de compostos coextraídos junto aos piretróides, por exemplo, os ácidos graxos, esteróis e glicerídeos. Nesta etapa de *clean up*, são utilizados procedimentos como extração líquido-líquido e por adsorção com fases a base de sílica modificada (C18 e PSA) além de aluminas e florisil.

4.4.1.1 Métodos de extração

Os métodos mais empregados na extração de piretróides em amostras complexas envolvem técnicas como: dispersão da matriz em fase sólida (*MSPD*), extração com solventes e sais (*QuEChERS*), líquido-líquido ou sólido-líquido e extração assistida por ultrassom (*EAU*). Outros métodos como soxhlet, extração acelerada por solvente, micro extração em fase sólida (*SPME*) também podem ser utilizados¹⁰⁶.

A utilização da *MSPD*, introduzida por Barker e colaboradores¹⁰⁷ em 1989, é utilizada na extração de piretróides em amostras de origem animal. A técnica envolve a moagem da amostra em conjunto com uma fase sólida dispersante (adsorvente), a qual deve ser escolhida de acordo com a afinidade dos analitos de interesse. Além da função de adsorvente, o dispersante tem a finalidade de agir como abrasivo, rompendo a estrutura física da matriz. A escolha do tipo de molécula ligada na superfície do adsorvente deve levar em consideração a polaridade dos analitos de interesse e a natureza da amostra. A mistura

resultante da moagem é empacotada em um cartucho e os analitos podem ser eluídos através de um solvente adequado¹⁰⁸. Em razão da lipofilia dos piretróides, as fases adsorventes mais empregadas são a C8 e C18^{27; 109}. Uma das vantagens da MSPD é a possibilidade de agregar a etapa de *clean up* diretamente ao processo, além de ser uma técnica que apresenta baixo consumo de solventes e de rápida execução¹⁰⁸.

O método QuEChERS foi introduzido por Anastassiades e colaboradores em 2003¹¹⁰, descrito como rápido, fácil, econômica, efetivo, robusto e seguro na extração de resíduos de agrotóxicos em vegetais e frutas. A base do método está na adição de solvente orgânico (ACN é a mais utilizada) à uma determinada quantidade de amostra em um tubo, agregando sulfato de magnésio e cloreto de sódio seguido de agitação. Este sistema formado é centrifugado, ocorrendo uma partição L-L entre a ACN e a água presente na amostra. Essa partição ocorre devido aos sais presentes que também proporcionam o efeito *salting out*². Em uma segunda etapa, dá-se a adição de sulfato de magnésio e aminas primárias e secundárias (PSA) na forma dispersiva. Esta segunda etapa tem a função de *clean up*, removendo água e interferentes mais polares. O método QuEChERS pode apresentar algumas variações, por exemplo, a adição de uma etapa tamponante com adição de acetato de sódio ou uma mistura de citrato de sódio diidratado e hidrogenocitrato sesquihidratado com o intuito de aumentar as recuperações. Em 2005 Lehotay e colaboradores¹¹¹ avaliaram a aplicação do QuEChERS na extração de resíduos de agrotóxicos em matrizes de origem animal. Atingiram bons resultados de recuperação e *clean up*, modificando apenas a fase dispersiva através da inclusão de uma fase mais apolar como a C18.

A utilização de ACN como solvente no método de QuEChERS favorece a separação das fases além de não extrair parte dos interferentes lipofílicos da matriz. A rapidez do processo, o baixo consumo de solventes, a utilização de reagentes relativamente baratos e os bons resultados de recuperação são algumas das vantagens da utilização do QuEChERS. Alguns exemplos da sua utilização na extração de piretróides em matrizes biológicas são em leite¹¹², peixe¹¹³ e músculo de frango¹¹⁴.

A extração líquido-líquido (ELL) também pode ser empregada em matrizes de origem animal. Envolve a adição de um solvente extrator à amostra com posterior agitação e centrifugação. Na extração ELL ocorre a partição da amostra em duas fases, uma orgânica e

² A adição de sais diminui a solubilidade de moléculas orgânicas no meio aquoso além de promover a precipitação das proteínas.

outra aquosa. A eficiência da extração vai depender da afinidade do analito pelo solvente de extração, número de extrações e da razão entre as fases. Os solventes hexano, ACN, diclorometano e acetato de etila são corriqueiramente utilizados na extração de piretróides¹¹⁵; 116; 117.

A extração assistida por ultrassom (EAU) tem se mostrado eficiente, rápida e de amplo espectro quando aplicada a alimentos com o intuito de extrair agrotóxicos. A escolha correta do solvente de extração também é um fator importante, assim como ocorre na ELL. Porém o diferencial da EAU está nos efeitos das ondas mecânicas gerados no transdutor do equipamento ultrassom. Elas proporcionam uma maior penetração do solvente na matriz de origem animal sólida melhorando a transferência de massa devido aos efeitos de *microstreaming*³ e ao rompimento das células. No ultrassom as frequências estão acima das percebidas pelos humanos. Os equipamentos estão divididos em dois grupos: os de alta intensidade (16-100 KHz) e baixa intensidade (100 KHz-1MHz). Comercialmente podem ser encontrados na forma de sonda ou banho. O banho apresenta vantagens como o número de amostras que podem ser processadas ao mesmo tempo. Os equipamentos de alta intensidade são utilizados no preparo de amostras de origem animal, eles produzem ondas capazes de alterar as propriedades físicas e químicas dessas matrizes¹¹⁸.

O princípio da EAU está embasado na sonicação, onde são criadas ondas longitudinais no líquido, gerando regiões de rarefação e compressão alternadas nas moléculas do meio. Nessas regiões, ocorre variação de pressão e cavitação dando origem a bolhas de gás. Essas bolhas estão expandidas nas regiões de rarefação e comprimidas nas regiões de compressão. A energia ultrassônica não é suficiente para manter a fase gasosa da bolha, desta forma, ocorre uma rápida condensação e por consequência uma alta liberação de energia. As moléculas condensadas colidem violentamente gerando ondas de choque, nestas regiões a temperatura pode chegar até 5500 °C e a uma pressão de 50 Mpa (**Figura 11**). A cavitação pode aumentar a transferência de calor e massa e acelerar dramaticamente a reatividade química no meio. De modo geral, a EAU de compostos orgânicos a partir de matrizes sólidas proporciona um maior contato entre a matriz e o solvente devido ao aumento da pressão que

³ É o movimento unidirecional de fluidos ao longo das membranas celulares, ocorre como resultado das mudanças de pressão mecânica dentro do campo de ultrassom. Pode alterar a estrutura e permeabilidade da membrana.

favorece a penetração e o transporte, e a temperatura que favorece a solubilidade e a difusividade¹¹⁹.

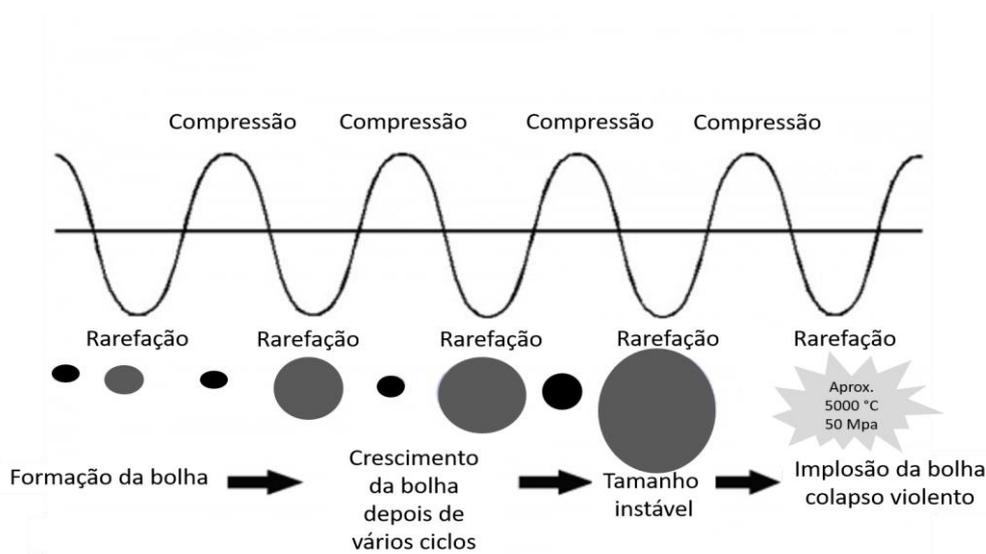


Figura 11. Processo de cavitação formado por ultrassom. [adaptado da Hielscher].

4.4.1.2 Métodos de *clean up*

Uma etapa de *clean up* eficiente melhora a sensibilidade, permite resultados mais consistentes e reprodutíveis, além de colaborar para uma menor contaminação da instrumentação analítica. Os processos de extração em matrizes complexas não extraem apenas os analitos de interesse. Nas matrizes de origem animal, o material lipofílico dentre outros compostos podem ser coextraídos. Os principais interferentes coextraídos deste tipo de matriz são os ácidos graxos, triglicerídeos e compostos relacionados ao colesterol^{101; 120}. É importante a remoção total ou parcial destes compostos, que pode ser realizada por partição com solventes, centrifugação-congelamento, MSPD e extração em fase sólida (SPE)¹⁰³.

A combinação de extração líquido-sólido com congelamento colabora para o *clean up*, uma vez que, o abaixamento de temperatura ($< -20\text{ }^{\circ}\text{C}$) faz com que a maioria dos lipídios solidifiquem, enquanto que os analitos de interesse permanecem no meio líquido (solvente)^{117; 121}. Neste congelamento ocorre a formação de uma camada viscosa, composta, principalmente, por lipídios. Esta camada pode ser centrifugada ou ser utilizada como separador de fases, dependendo do solvente utilizado. Com hexano¹¹⁷ é comum efetuar a centrifugação. No entanto, quando é utilizado ACN a camada pode ser utilizada como separador de fases e outra vantagem da utilização de ACN está na menor solubilidade de alguns lipídios neste solvente^{103; 115}.

A SPE e a extração em fase sólida dispersiva D-SPE podem ser utilizadas como etapa de *clean up* a fim de remover os interferentes coextraídos. Os adsorventes como florisil^{101; 109; 117}, PSA¹⁰¹, C18^{12; 101; 122} e as aluminas^{12; 122} são os mais utilizados. A principal função destas fases é a de reter os lipídios. No *clean up* a utilização de cartuchos de SPE é feita de forma diferente daquela que ocorre na SPE com o intuito de extrair e concentrar os analitos. Na SPE voltada para o *clean up* da amostra, as etapas de condicionamento do cartucho e recolhimento do eluato são fundamentais (**Figura 12**). Na D-SPE os adsorventes são adicionados ao extrato, com o intuito de remover os interferentes. As vantagens da D-SPE está no uso de menor quantidade de adsorventes e solventes além de não haver a necessidade de trabalhar no sistema de cartucho.

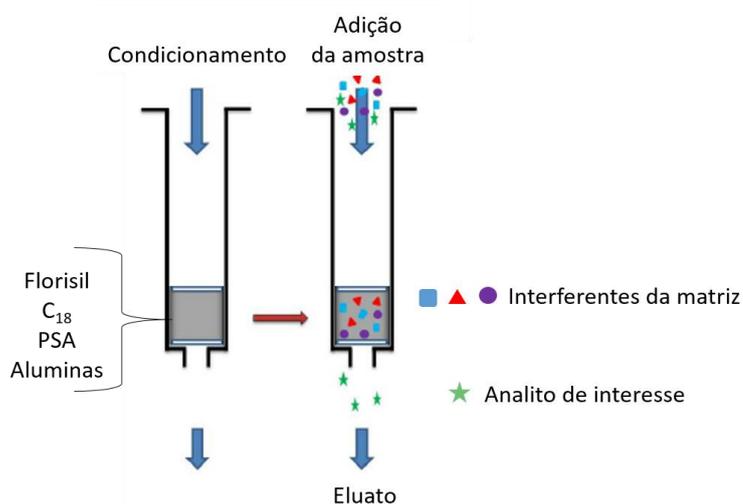


Figura 12. Etapas da SPE na *clean up*.

Grande parte dos métodos analíticos publicados utilizam uma etapa de remoção de traços de água do extrato. Esta etapa é fundamental nas metodologias baseadas em cromatografia a gás. Os principais sais utilizados são sulfato de sódio ou de magnésio^{112; 123}. Estes sais também colaboram na desintegração da amostra quando utilizado MSPD ou para particionar, por exemplo, amostras de leite na extração L-L¹⁰³. Nos casos em que as amostras estejam liofilizadas esta etapa de secagem não se faz necessária³⁶.

Recentemente, foi introduzido no mercado o produto EMR-lipídio, que tem como função básica melhorar a remoção de lipídios na etapa de *clean up* de matrizes com alto teor de lipídios. Este produto dissolve-se na solução de extrato e seu mecanismo pode envolver exclusão por tamanho e interações hidrofóbicas. Hidrocarbonetos de cadeia longa associados

aos lipídios se encaixam dentro da estrutura do EMR, que é precipitada ao final do processo¹²⁴. Han e colaboradores¹⁰⁴ avaliaram a eficiência do EMR em músculo de peixe, de suíno, de couve e abacate, todas com alto teor de lipídios. O *clean up* EMR foi utilizado após o processo de QuEChERS e comparado ao *clean up* utilizando fases como C18, PSA e adsorvente com zircônio. O método contemplou 65 agrotóxicos (7 piretróides). A remoção de coextratos foi de 39 a 81% mais eficiente nos casos em que utilizaram o EMR e os valores de recuperação dos piretróides foram semelhantes em ambos os casos.

4.4.2 Técnicas instrumentais

Após os processos de extração e *clean up*, os extratos resultantes seguem para a análise instrumental por cromatografia a gás (GC) ou cromatografia a líquido (LC) dependendo das características dos analitos (polaridade, volatilidade e estabilidade térmica). A identificação e quantificação podem ser realizadas por diferentes detectores, dependendo das moléculas a serem analisadas. Até o final da década de 90, os detectores mais clássicos como os detectores de nitrogênio-fósforo, de fluorescência, de arranjo de diodos (DAD) e o detector de captura de elétrons (ECD) foram amplamente utilizados¹⁰³. Na última década, ainda é possível encontrar trabalhos de pesquisa que utilizaram estes sistemas clássicos de detecção na análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem animal^{123; 125}. Nas últimas décadas, os avanços tecnológicos nos acoplamentos com espectrômetros de massa, permitiu avanços significativos na análise de ultra traços. A grande vantagem frente às outras formas de detecção está na especificidade e seletividade da espectrometria de massa.

Os agrotóxicos apresentam uma grande variação de polaridade e de acordo com a evolução, a cromatografia a gás e a líquido acopladas a espectrometria de massa (GC-MS e LC-MS/MS) passaram a ser a instrumentação de escolha para a determinação destes analitos. Atualmente, a preferência é pela técnica da LC-MS/MS pois as etapas de preparo de amostra são mais simples quando comparada ao preparo de amostra para a técnica de GC-MS. Porém, devido a estrutura e propriedades físico-químicas, os piretróides apresentam resultados analíticos melhores quando analisados por cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons (GC-ECD) ou por GC-MS. Outra vantagem na utilização da cromatografia a gás está na possibilidade da separação isomérica. Colunas convencionais de GC são capazes de separar alguns dos isômeros dos piretróides, fornecendo maior riqueza de informações nos resultados, o que não ocorre na cromatografia a líquido quando são utilizadas colunas convencionais^{126; 127}.

Os piretróides são moléculas lábeis, poucas publicações tem relatado a análise de mais de 10 piretróides na mesma metodologia, pois existe uma diferença de sensibilidade entre as técnicas utilizadas. Por exemplo, a flumetrina não apresenta boa sensibilidade na análise por GC-MS utilizando ionização por impacto eletrônico, assim como a ciflutrina, fenvalerato e as piretrinas por LC-MS/MS utilizando ionização por *electrospray*. De um modo geral, esses métodos capazes de quantificar os piretróide em concentrações próximas a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ¹²⁷.

4.4.2.1 Cromatografia a Líquido acoplada a espectrometria de Massa

Nos últimos anos, a possibilidade de acoplar a cromatografia a líquido à espectrômetros de massa em *tandem* (LC-MS/MS) impulsionou a aplicação desta técnica na análise de agrotóxicos em alimentos e no meio ambiente.

Han e colaboradores ¹²⁶ fizeram um comparativo entre as técnicas LC-MS/MS e GC-MS/MS na análise multiresíduos de agrotóxicos em músculo bovino, suíno e de frango. Dentre os agrotóxicos avaliados: os piretróides cialotrina, cipermetrina, bifentrina, deltametrina, ciflutrina, permetrina e fenpropatrina. Na comparação entre as técnicas, a LC-MS/MS apresentou menor sensibilidade para estes piretróides, colocando a GC-MS/MS como a melhor escolha para alcançar maior sensibilidade.

Nas metodologias por LC-MS/MS as colunas de fase reversa como octadecilsilano (C_{18}) são as mais empregadas na separação dos piretróides ¹⁰⁶. As três formas de ionização branda presentes no acoplamento LC-MS/MS são: ionização por *electrospray* (ESI), ionização química a pressão atmosférica (APCI) e a fotoionização a pressão atmosférica (APPI). Na determinação de piretróides a ESI no modo positivo é a mais utilizada (**Apêndice B**, página 81). Porém, estas formas de ionização não apresentam boa performance para compostos apolares, tais como, os piretróides.

4.4.2.2 Cromatografia a Gás com Detecção por Captura de Elétrons

A GC-ECD é utilizada pela sua alta sensibilidade na análise de compostos que contenham halogênios em sua estrutura, que é o caso de muitos agrotóxicos, inclusive os piretróides. O detector de captura de elétrons, foi um dos mais populares na análise de agrotóxicos, porém com o avanço nos acoplamentos com espectrômetros de massa o seu uso entrou em declínio ^{10; 128; 129}. Mesmo sendo uma técnica muito sensível ela não é capaz de fornecer a especificidade alcançada na espectrometria de massa.

4.4.2.3 Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massa

A cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massa (GC-MS) (**Figura 13**) é a técnica instrumental mais utilizada quando os analitos de interesse são os piretróides.

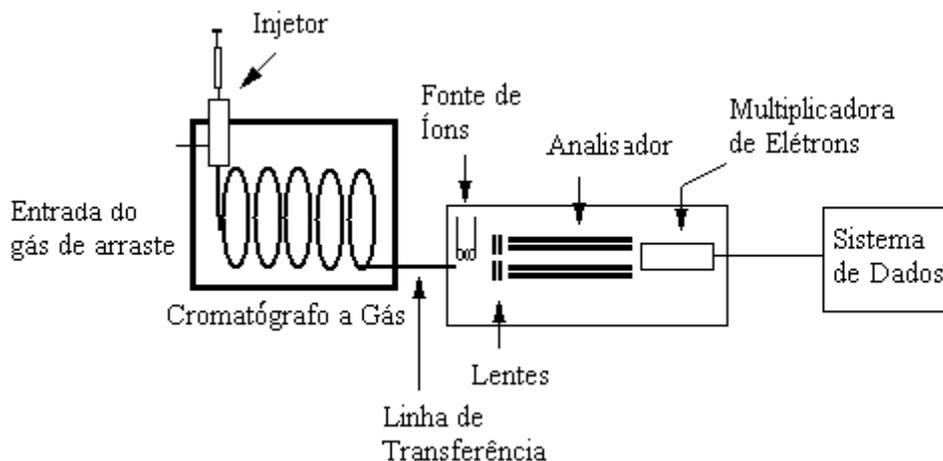


Figura 13. Representação esquemática de um cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massa.

No cromatógrafo a gás os principais compartimentos são o injetor e o forno. No injetor temos a câmara de injeção que tem o *liner* como principal componente, já no forno temos a coluna. Estes dois componentes são de fundamental importância na volatilização da amostra que ocorre no *liner* e na separação dos compostos realizada pela coluna. As matrizes de origem animal com alto teor de lipídios podem afetar estes componentes. Mesmo que o preparo de amostra contemple etapas de *clean up*, frações de lipídios podem permanecer e prejudicar o desempenho analítico, uma vez que ficam aderidos nestes componentes. As consequências disso são a variação dos tempos de retenção e a diminuição da sensibilidade. Para amenizar estes problemas a utilização de *backflushing*⁴ ou pré-coluna são alternativas quando se trata de amostras com esta complexidade^{103; 104}. As colunas comumente utilizadas na determinação de piretróides são de baixa polaridade com 5% de fenil na fase de polidimetilsiloxano (DB-5MS; HP-5MS; ZB-5MS) nos comprimentos de 15, 30 e 60 metros¹⁰⁶. Devido a presença de isômeros, colunas quirais, tais como BGB 172¹²² e CDX-B⁷⁶ também são empregadas. Cabe salientar que o piretróide tralometrina (**Apêndice C**, página 86) sofre degradação térmica no injetor do GC e transforma-se em deltametrina¹³⁰.

⁴ Sistema que reverte o fluxo de gás de arraste com o intuito de remover os compostos de alto ponto de ebulição que não são os componentes visados.

O espectrômetro de massa (MS) tem uma estrutura básica formada por três partes: fonte, analisador e o detector.

A fonte é onde ocorre a ionização, a formação de íons é uma etapa fundamental na MS. Dentre as técnicas de ionização utilizadas no acoplamento da GC com a MS a ionização por impacto eletrônico (EI) e a ionização química (CI) são as mais comuns. A ionização por EI é a mais utilizada (**Apêndice B**, página 81), gera íons moleculares (M^+) e íons fragmentos, oriundos da fragmentação do M^+ . Na EI os analitos em fase gasosa são bombardeados por elétrons com uma energia tipicamente de 70 eV (**Figura 14**). Em um primeiro momento ocorre a formação de íons moleculares, muitos destes, apresentando um excesso de energia, que é dissipada com a quebra de ligações, resultando na fragmentação dos M^+ . Estes fragmentos podem ser cátions, ânions, radicais livres e neutros¹³¹.

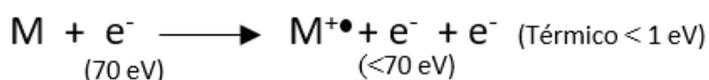


Figura 14. Representação da ionização por impacto eletrônico.

Já a ionização química é uma técnica de ionização branda, onde há pouca transferência de energia para o analito. Na maioria das vezes o pico base do espectro de massa oriundo da ionização química é do próprio íon molecular. O princípio básico desta técnica envolve a colisão entre o analito em fase gasosa e o gás reagente na forma de íon.

A ionização do gás reagente ocorre de forma preferencial devido à pressão do gás na câmara de ionização, ela ocorre através da colisão entre elétrons lançados do filamento a energias superiores a 70 eV com o gás reagente. Cabe salientar a necessidade de sistemas de vácuo potentes para que todo esse gás adicional seja removido. O gás metano ou isobutano e o gás amônia são exemplos de gás reagente, comumente utilizados no modo positivo e no negativo, respectivamente. De modo geral, os métodos baseados em CI apresentam uma maior sensibilidade, fato devido à baixa fragmentação e as relações m/z avaliadas serem do íon molecular, mesmo que os gases reagentes possam contribuir para o aumento do ruído da linha de base.

Na ionização química no modo positivo (PCI) existem quatro processos fundamentais de ionização: transferência de próton; abstração de hidreto; troca de cargas e adição. Os mais comuns são: a transferência de próton (oriundo do gás reagente) para a molécula neutra e a adição ou formação de adutos^{132; 133}.

Na ionização química no modo negativo (NCI) existem quatro mecanismos principais envolvidos: captura de elétrons, formação de par iônico, dissociação pela captura de elétrons e reações íon molécula. Com exceção do mecanismo da reação íon molécula o gás tem uma função diferente, funciona como um gerador de elétrons térmicos (**Figura 15**). Essa geração ocorre quando há colisão entre elétrons emitidos do filamento com uma energia superior a 100 eV colidem com o gás reagente (GR).



Figura 15. Representação da formação dos elétrons térmicos e íons reagentes (IR) a partir do gás reagente (GR).

São estes elétrons térmicos que reagem com as moléculas da amostra. Os elétrons térmicos apresentam níveis de energia mais baixos que os elétrons provenientes do filamento. Isto explica o fato da NCI ser chamada de ionização branda, ou seja, com pouca fragmentação do analito de interesse.

Watson e Sparckman¹³³ discutem a nomenclatura da NCI, abordando que apenas o mecanismo de íon molécula deveria ser chamado de NCI enquanto que os outros deveriam ser chamados de ionização negativa por captura de elétrons (ECNI). Nesta tese o termo NCI refere-se a todos os mecanismos.

O modo NCI torna o método mais sensível do que quando é utilizado a EI e PCI. Na NCI não ocorre a formação de íons negativos do gás reagente na geração dos elétrons térmicos, isto reduz o ruído. Outra vantagem está no menor número de compostos capazes de ionizar na forma negativa do que os que ionizam na forma positiva, quando se trata de amostras complexas. Para os piretróides a ionização química no modo negativo (NCI) é a mais indicada por ser uma ionização branda, visto que, na ionização por EI eles sofrem intensa fragmentação, gerando fragmentos de baixa m/z , bem como, a formação de fragmentos similares. Utilizando a GC/NCI-MS/MS é possível alcançar sensibilidade superior a cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons³¹.

Após a formação dos íons na câmara de ionização, de acordo com a polaridade, eles são direcionados para o analisador de massa que pode ser do tipo quadrupolo linear, *íon trap*, setor magnético ou *time of flight* (TOF). O quadrupolo linear é o mais utilizado, por ser

compacto, de menor custo e de fácil operação. É considerado um filtro de massa, em sua forma mais comum é constituído por quatro hastes hiperbólicas dispostas paralelamente em um arranjo radial. A combinação ideal da corrente elétrica do tipo contínua e radiofrequência é capaz de gerar um campo eletrostático oscilante entre as hastes, onde apenas íons com determinada razão m/z são direcionados até o detector. O analisador quadrupolo linear é de fácil acoplamento em *tandem* (MS/MS), sendo o triplo quadrupolo (QqQ) muito utilizado na análise de agrotóxicos¹³¹.

Em análises utilizando o analisador do tipo quadrupolo linear, o modo escolhido para a aquisição dos dados está intimamente relacionado a sensibilidade e especificidade do método. É possível citar os modos de varredura como o cromatograma de íons totais (TIC), monitoramento de íon selecionado (SIM) e o monitoramento de reações múltiplas (MRM). Na GC-MS é possível utilizar os modos TIC e SIM, já na GC-MS/MS são possíveis os três modos citados. No TIC é feita uma varredura completa de todos os íons formados na etapa de ionização durante todo o tempo de aquisição, dentro da faixa de m/z estipulada. Este modo é utilizado para determinar os fragmentos de maior intensidade ou íon molecular formado. No modo SIM são selecionados íons de interesse, em tempos de aquisição determinados, coincidentes com os analitos de interesse. No acoplamento MS/MS esses íons são chamados de precursores. O modo MRM é possível com o acoplamento em *tandem*, na forma de triplo quadrupolo (QqQ). No MRM os íons monitorados no primeiro quadrupolo são denominados “íons precursores”, os quais sofrem uma fragmentação na célula de colisão, destes novos íons formados os mais intensos serão filtrados pelo segundo quadrupolo, denominados “íons produtos”, ou seja, os íons provenientes da fragmentação dos íons selecionados no primeiro analisador de massa (íons precursores). A **Figura 16** representa um QqQ. Os quadrupolos podem operar de forma independente entre eles. Os ensaios MRM são particularmente úteis para as análises específicas de compostos alvo em misturas e matrizes complexas. Todos os analitos podem ser quantificados com precisão porque suas transições de íons MRM são mutuamente exclusivas, permitindo a exclusão dos interferentes. O sinal dos “íons produto” geralmente diminui, mas a diminuição do ruído é muito maior, aumentando a relação do sinal-ruído.

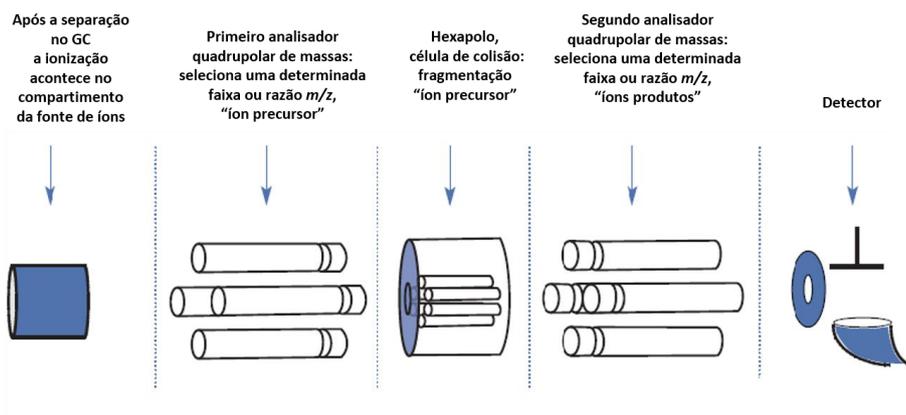


Figura 16. Representação esquemática de um espectrômetro de massa em tandem com analisadores quadrupolos lineares. [adaptado da Agilent¹³⁴].

Com a espectrometria de massa é possível trabalhar com a primeira geração de íons (íons precursores) no MS e com maior especificidade na (MS/MS) trabalhando com a segunda geração de íons (íons produtos). Como pode ser observado no **Apêndice B** (página 81) a grande maioria dos estudos optaram pela GC-MS ou GC-MS/MS na determinação de piretróides.

4.5 METODOLOGIA DE ANÁLISE PARA CLORPIRIFÓS

Os métodos analíticos para determinação do clorpirifós em alimentos de origem animal (leite, músculo bovino, de frango, de búfalo e suíno) envolvem técnicas de extração e instrumentação analítica similar às empregadas aos piretróides, devido à similaridade das propriedades físico-químicas. Estas metodologias envolvem principalmente QuEChERS, no preparo de amostra e GC-MS, ou MS/MS e LC-MS/MS para a análise instrumental^{126; 135; 136}.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 PADRÕES E REAGENTES

Os padrões certificados utilizados foram: aletrina (ALE), *cis*-bifentrina (BIF), clorpirifós (CLO), ciflutrina (CIF), (*cis*1/*cis*2)cialotrina (CIA), cipermetrina (CIP), deltametrina (DEL), fenvalerato (FENV), flumetrina (FLU), τ -fluvalinato (FLUV), imiprotrina (IMI), kadetrina (KAD), permetrina (PER), fenotrina (FEN), praletrina (PRA), resmetrina (RES), tetrametrina (TET), e a transflutrina (TRA). Estruturas químicas e fórmulas moleculares estão apresentadas no **Apêndice C** (página 86). Os padrões internos marcados⁵ com deutério foram: d₁₀-clorpirifós, d₆-*trans*-permetrina, d₆-*trans*-cipermetrina. Todos foram adquiridos do Dr. Ehrenstorfer® (Augsburg, Germany). Os solventes foram obtidos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA) de pureza grau HPLC ou superior. As soluções padrão foram preparadas em acetato de etila. Os cartuchos de SPE utilizados foram C18, 2 g, 15 mL⁻¹ da Insolute Biotage® e alumina básica, 5 g, 25 mL⁻¹ da Interchim®.

5.2 AMOSTRAGEM

Todas as amostras foram fornecidas pelo Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO-RS). As amostras foram coletadas aleatoriamente pelo serviço veterinário oficial em conformidade com o plano nacional de controle de resíduos e contaminantes no primeiro trimestre de 2015. A metodologia validada foi utilizada para a análise de 152 amostras (53 de músculo de frango, 38 de leite bovino, 32 de ovos, 18 de músculo bovino e 11 de músculo de peixe). Das 32 amostras de ovos, 5 foram analisadas com segregação entre clara e gema.

5.2.1 Amostras de leite coletadas de animal com histórico de aplicação de inseticida

Um inseticida comercial com princípio ativo cipermetrina, foi aplicado em uma vaca, pelo método *pour on*⁶, A dosagem administrada foi de 10 mL de uma solução 6% de cipermetrina (p/v) para cada 100 kg de peso vivo do animal. As ordenhas ocorreram a cada 12 horas, o volume por ordenha foi de 6 litros. Um total de 4 ordenhas foram coletadas, nos tempos 0, 12, 24 e 36 horas.

⁵ Um padrão interno marcado isotopicamente é um padrão interno com a mesma estrutura química e composição elementar que o analito alvo, mas um ou mais dos átomos da molécula do analito alvo são substituídos por isótopos (por exemplo, o deutério).

⁶ Aplicação tópica no dorso do animal, utilizado para inseticidas de ação sistêmica.

5.3 LIOFILIZAÇÃO

As amostras de músculo bovino, peixe e frango foram trituradas e transferidas para tubos Falcon. As amostras de leite foram transferidas diretamente para os tubos Falcon. As amostras de ovos foram segregadas em clara e gema. Utilizou-se em torno de 15 g de cada amostra. Todas as amostras foram congeladas a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por no mínimo 12 horas. As amostras congeladas foram liofilizadas por 72 h (bovino, peixe e frango), 96 h (ovos) e 120 h (leite) a 0,05 mm Hg e $-52\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando o liofilizador Liotop L 101 (Liobras, São Carlos, SP, Brasil).

Todas as amostras foram pesadas antes e após o processo de liofilização. A diferença de massa foi atribuída à perda de água e permitiu calcular o percentual de umidade inicial e compará-la com a literatura científica. A proximidade com os valores estabelecidos permite identificar o ponto final de liofilização. Também, para algumas amostras, foram realizadas medidas da atividade de água (a_w). Valores inferiores a 0,1 de a_w foram considerados satisfatórios. A avaliação visual das amostras também foi realizada. As amostras que apresentaram indícios de que a liofilização não havia sido finalizada foram novamente congeladas e liofilizadas.

5.4 TEOR DE LIPÍDIOS

Os piretróides são lipossolúveis e tendem a migrar para a fração lipídica do alimento. Devido à isso é importante a determinação de lipídios a fim de relacionar a quantidade de gordura com a quantidade de inseticidas. A determinação do teor de gordura foi realizada por análise gravimétrica, em triplicata para cada matriz. Nas amostras, realizou-se apenas uma medida para cada amostra.

As amostras liofilizadas (1,0 g) foram sonicadas com 20 mL de hexano : diclorometano (2:1) por duas vezes. O tempo de cada sonicação foi de 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, os extratos foram centrifugados a uma força centrífuga relativa de $2602 \times g$ por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e colocado em um tubo seco e previamente pesado a peso constante. Evaporou-se este sobrenadante sob fluxo de N_2 . Após, o tubo foi novamente seco em estufa até peso constante e a diferença entre os pesos é o teor de lipídio.

5.5 EXTRAÇÃO E *CLEAN UP*

Previamente à extração e *clean up*, as amostras liofilizadas foram homogeneizadas. Para isso, utilizou-se *gral* e *pistilo* para moer as amostras até um granulado finamente dividido. Pesou-se exatamente 0,100 g para matrizes com mais de 10% de lipídios (leite e ovos) e 0,300 g para matrizes com quantidades de lipídios inferiores a 10%. Estas porcentagens referem-se as matrizes liofilizadas. Após a pesagem, as amostras foram fortificadas com 1 ng de *d*₆-*trans*-cipermetrina 2 ng de *d*₆-*trans*-permetrina e 4 ng de *d*₁₀-clorpirifós e deixadas na geladeira por 24 h para difusão do padrão marcado de acordo com o protocolo do laboratório. A extração foi realizada através da sonicação com 20 mL de uma mistura de hexano:diclorometano (2:1) por duas vezes, sendo o tempo de cada sonicação de 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida os extratos foram centrifugados a uma força centrífuga relativa de 2602 ×*g* por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e evaporado sob fluxo de N₂. Após utilizou-se 30 mL de acetonitrila (ACN) para ressuspender o extrato.

Para a etapa de *clean up* se fez uso de um *tandem* de cartuchos de SPE, alumina básica na parte superior e C18 na parte inferior. Para condicionar os cartuchos utilizou-se 25 mL de ACN. Os 30 mL de ACN com o material seco ressuspensão foram eluídos através dos cartuchos. Este eluído foi evaporado sob fluxo de N₂ e ressuspensionado com 100 µL de acetato de etila para posterior análise por GC/NCI-MS/MS.

5.6 CONDIÇÕES DA ANÁLISE POR GC/NCI-MS/MS

O equipamento utilizado foi um GC (7890A) acoplado a um espectrômetro de massa MS/MS triplo quadrupolo (7000A) ambos da Agilent Technologies e utilizados no IDAEA-CSIC na Espanha. O modo de ionização foi ionização química no modo negativo, utilizando o gás amônia como gás reagente. A coluna utilizada foi uma DB-5-MS (15 m × 0,25 mm i.d. × 0,1 µm espessura do filme), com utilização de uma pré-coluna de sílica fundida com comprimento de 2 m para proteção da coluna. O gás de arraste foi hélio com fluxo de 1,2 mL min⁻¹ (fluxo constante). O volume de injeção foi de 3 µL, no modo de injeção *splitless* pulsado mantido por 2 min. A temperatura de injeção foi de 270 °C. A programação da temperatura iniciou em 100 °C mantido por 1 min passando para 230 °C a uma taxa de aquecimento de 20 °C min⁻¹, em seguida para 265 °C a uma taxa de 10 °C min⁻¹ e a uma taxa de 20 °C min⁻¹ até 310 °C onde foi mantida por 2 min. As temperaturas da linha de

transferência e da fonte de ionização foram de 275 °C e 250 °C, respectivamente. Utilizou-se uma pressão de $2,04 \times 10^{-4}$ Torr do gás reagente.

Para melhorar a resolução de separação dos diastereoisômeros da ciflutrina e cipermetrina utilizou-se a coluna BetaDex™-325 (30 m × 0,25 i.d. × 0,25 µm espessura do filme) e para proteção da coluna se fez uso de uma pré-coluna de sílica fundida com comprimento de 2 m. O gás de arraste foi hélio a $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ no modo fluxo constante. O volume de injeção foi de 2 µL, no modo *splitless* pulsado (mantido por 2 min), na temperatura de injeção de 270 °C. A programação da temperatura iniciou em 180 °C mantido por 2 min passando para 220 °C a uma taxa de aquecimento de 8 °C min^{-1} , mantido a esta temperatura por 30 min, em seguida para 230 °C a uma taxa de 8 °C min^{-1} onde foi mantida por 40 min. A temperatura da fonte de ionização foi de 250 °C e a pressão do gás reagente de $2,04 \times 10^{-4}$ Torr.

Os parâmetros do espectrômetro de massa utilizados, tais como: transições monitoradas, energia de colisão e valores de *dwell time*⁷ podem ser observados no **Apêndice D** (página 89).

5.7 CONFIABILIDADE DOS RESULTADOS ANALÍTICOS

A fim de verificar a confiabilidade dos resultados da análise quantitativa, foram avaliados os seguintes parâmetros do método: recuperação, precisão intermediária, faixa linear de trabalho e os limites de detecção e quantificação seguindo os guias do MAPA e SANCO^{137; 138}. Se fez uso de padrão interno marcado, considerado uma das melhores formas de compensar os efeitos da matriz. Os testes de recuperação foram realizados de acordo com o esquema apresentado na **Figura 17**. Três repetições foram feitas para cada matriz em dois níveis de fortificação (1 e 5 ng). Um experimento designado como “branco” foi realizado a fim de determinar a possível presença de algum dos inseticidas nas matrizes.

⁷ Tempo de aquisição para o monitoramento de cada transição do íon (MRM).

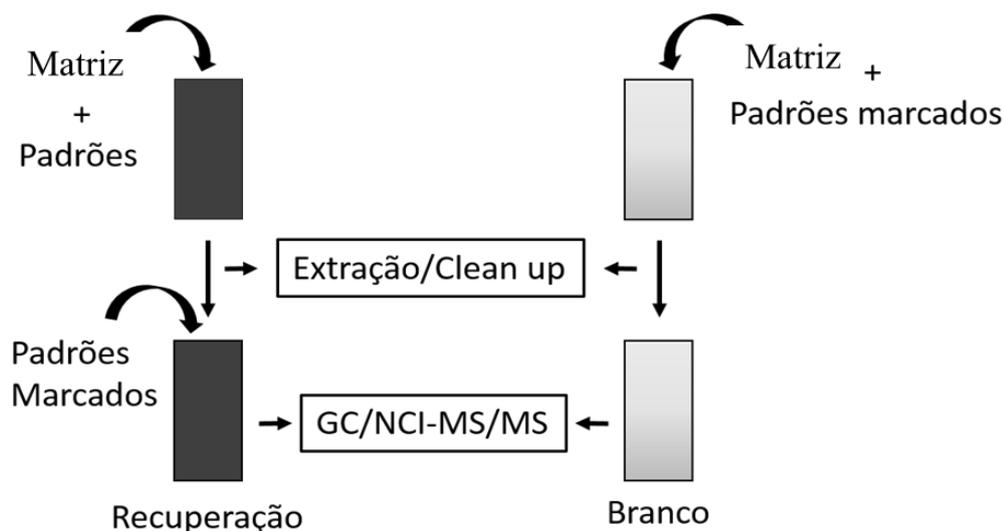


Figura 17. Metodologia utilizada para verificar a recuperação dos analitos nas diferentes matrizes (frango, bovino, peixe, leite e ovos).

Para avaliar a precisão intermediária foram realizados experimentos em quintuplicata em dias alternados nas diferentes matrizes no nível de fortificação de 1 ng. Para determinar a faixa linear de trabalho foram preparadas 11 concentrações (75; 50; 25; 10; 5; 2,5; 1,0; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 ng mL⁻¹) através de diluição isotópica. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados a partir da relação sinal/ruído com valores de 3 para o LD e 10 para o LQ. Os valores do sinal/ruído foram calculados através do menor nível de fortificação (1 ng) em cada uma das matrizes. No caso dos isômeros, o isômero de menor valor de sinal/ruído foi utilizado para calcular os LDs e LQs. Também se tomou o cuidado em selecionar as mesmas regiões dos cromatogramas das diferentes matrizes para calcular o ruído. Todo processamento de dados foi realizado no *software* Mass Hunter (Agilent TechnologiesTM). A quantificação foi realizada pelo somatório dos isômeros.

5.8 PERFIL ISOMÉRICO

Os piretróides apresentam isômeros, os quais podem exibir um comportamento diferente nos ensaios de extração. Para acompanhar o perfil dos isômeros na extração se fez uso do fator isomérico (FI) para cada par de isômeros. O FI foi calculado utilizando a equação 1.

$$FI = \left(\frac{A_{mc}}{A_{mt}}\right) / \left(\frac{A_{sc}}{A_{st}}\right) \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

A_{mc} – área do pico do diastereoisômero ou enantiômero que elui primeiro nos testes com a matriz.

A_{mt} – área do pico do diastereoisômero ou enantiômero que elui depois nos testes com a matriz.

A_{sc} – área do pico do diastereoisômero ou enantiômero que elui primeiro nos testes em solvente.

A_{st} – área do pico do diastereoisômero ou enantiômero que elui depois nos testes em solvente.

Para a ciflutrina e cipermetrina que apresentam quatro picos, dois *cis* e dois *trans* a A_{mc} e A_{sc} são equivalentes a (*cis*1 + *cis*2) e A_{mt} e A_{st} equivalem a (*trans*1 + *trans*2). O FI avalia a proporção dos isômeros de um determinado piretróide entre a matriz e o solvente. Valores de FI entorno 1 significam que não houve mudança na proporção dos isômeros. Valores acima de 1 podem indicar a predominância do primeiro isômero, já valores abaixo de 1 podem indicar a predominância do segundo.

Normalmente, nas análises via GC o isômero *cis* elui antes de seu correspondente *trans*¹²². Os valores do FI podem indicar possíveis perdas no processo de extração, bioacumulação e diferentes taxas de biotransformação.

5.9 ESTIMATIVA DA INGESTA DIÁRIA

Foi realizado, através da equação 2, uma estimativa da ingesta diária (EID) desses inseticidas seguindo orientações da monografia europeia⁴⁶, a fim de comparar os resultados com os valores de ingesta diária aceitável (IDA).

$$EID_i = \sum(C_{ij} * P_j) / W \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

EID_i – estimativa de ingesta diária do inseticida **i**.

C_{ij} – nível do pesticida **i** no alimento **j** (mg kg⁻¹ ou mg L⁻¹).

P – consumo do alimento **j** por dia (kg dia⁻¹ ou L dia⁻¹).

W – peso corporal (kg).

Os valores de C_{ij} foram os quantificados neste trabalho. O consumo per capita de cada alimento utilizado para o cálculo da EID foram os seguintes:

- Músculo bovino – 0,100 kg dia/per capita, dado 2015¹³⁹.
- Músculo de frango – 0,118 kg dia/per capita, dado de 2015⁹³.
- Músculo de peixe – 0,040 kg dia/per capita, dado de 2009¹⁴⁰.
- Ovos – 0,029 kg dia/per capita, dado 2015¹⁴¹.
- Leite (integral e desnatado) – 0,039 L dia/per capita, dado de 2009¹⁴².

Os valores de consumo per capita são referentes à população brasileira. Por exemplo, a nível mundial a FAO, em 2015, estimou os seguintes valores: 0,227 kg dia/per capita de leite e derivados; 0,027 kg dia/per capita de músculo bovino e 0,037 kg dia/per capita de músculo de frango.

O peso médio de um adulto brasileiro masculino/feminino é 70,7 kg/66,4 kg¹⁴³. Para estimar a ingesta diária de resíduos foi utilizado o peso médio de 68,6 kg (indivíduo adulto brasileiro).

Os valores estimados da ingesta diária foram calculados utilizando a média das concentrações encontradas nas amostras. Também foi realizada uma estimativa crítica utilizando as maiores concentrações encontradas cujos resultados foram comparados com valores recomendados de IDA⁶⁰.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 TEOR DE LIPÍDIOS

O teor de lipídios e a quantidade de água foram determinados em cada matriz (Tabela 3).

Tabela 3. Teor médio de lipídio e de água nas matrizes: músculo bovino, de frango, de peixe, ovos e leite e desvio padrão relativo (n=3).

Matriz	% de água (DPR)	% de lipídio na matriz liofilizada (DPR)
Frango	74,2 (2,18)	4,95 (2,00)
Bovino	76,8 (4,29)	5,08 (2,37)
Peixe	76,7 (3,58)	2,02 (2,10)
Ovos	74,7 (2,46)	32,0 (0,20)
Leite	87,5 (1,92)	42,9 (0,30)

DPR-desvio padrão relativo

A matriz com menor quantidade de água foi a de frango com 74,2%, já a com maior quantidade de água foi o leite com 87,5%, o que justifica o maior tempo de liofilização. O teor de lipídios nas matrizes liofilizadas variou de 2,02% nos peixes até 42,9% nos ovos. Estes testes serviram para determinar a massa de material liofilizado a ser utilizada. Para as matrizes que apresentaram teor de lipídios inferior a 10% (frango, bovino e peixe) utilizou-se uma massa de 0,300 g. No caso do leite e ovos que apresentaram teores superiores a 10%, a massa utilizada foi de 0,100 g. Esta diferenciação de massas utilizadas se deve a preservação do sistema cromatográfico. Por mais eficiente que a etapa de *clean up* seja, frações de lipídios podem estar presentes prejudicando o desempenho analítico. Por este motivo optou-se em trabalhar com menores massas das amostras com maior conteúdo lipídico.

Os valores de a_w ficaram abaixo de 0,1 a_w para todas as amostras. O efeito da liofilização na a_w resulta em drástico decréscimo do crescimento microbiano (bacteriano e fúngico), das reações enzimáticas e não enzimáticas que podem alterar a matriz ou os contaminantes nela contidos. No entanto, a oxidação parece ter um comportamento mais complexo, apresentando-se elevada também em ambientes com baixa a_w . Neste caso, o processo de liofilização ocorreu com baixa pressão de oxigênio não favorecendo as reações oxidativas. O armazenamento dos materiais liofilizados a baixas temperaturas também colaborou na preservação das amostras. No desenvolvimento de um método analítico a amostra deve ser preservada de modo a manter a sua integridade, variações em sua

constituição original podem resultar em resultados inconsistentes. Todos os alimentos avaliados neste trabalho são perecíveis, podem sofrer diversos processos químicos e bioquímicos, alterando seu estado original. Neste sentido, a liofilização tende a assegurar a estabilidade além de facilitar a homogeneidade das amostras.

6.1.1 Relação entre o teor de lipídios e a quantidade de inseticidas

Os piretróides e o CLO são inseticidas lipofílicos e tendem a bioacumular nas gorduras dos animais, distribuindo-se pela cadeia alimentar, podendo, portanto, estarem presentes nos alimentos gordurosos avaliados neste trabalho. De posse dos resultados do teor de lipídios das amostras, utilizou-se a correlação não paramétrica de Spearman para relacionar o teor de lipídios com a quantidade desses inseticidas (**Tabela 4**). Segundo Hinkle e colaboradores os níveis de correlação são: 1,0-0,9 (muito forte); 0,9-0,7 (forte); 0,7-0,5 (média); 0,5-0,3 (baixa) e 0,3-0,0 (negligenciável)¹⁴⁴.

Tabela 4. Relação entre o teor de lipídios e a quantidade de piretróides e CLO nas matrizes de: músculo bovino, de frango, de peixe, ovos e leite representada pela correlação de Spearman.

Matriz	Média do teor de lipídio nas amostras liofilizadas (%)	DPR(tl)	Correlação de Spearman	Número de amostras
Frango	6,88	59,3	0,50	53
Bovino	6,09	80,1	0,82	18
Peixe	9,35	83,0	0,87	11
Ovos	35,3	9,75	0,21	27
Leite	24,8	30,4	0,07	38

DPR(tl) – desvio padrão relativo do teor de lipídios nas amostras liofilizadas

Nas amostras de músculo bovino e músculo de peixe houve forte correlação entre o teor de lipídio e a quantidade de inseticidas. Já nas amostras de músculo de frango houve uma média correlação. Os valores de DPR acima de 80% no teor de lipídios nas amostras de músculo bovino e músculo de peixe e acima de 59% nas amostras de músculo de frango favoreceram a realização da correlação. Esta correlação indica que estes inseticidas se acumulam na fração lipídica desses animais. É interessante observar o tempo de vida deles, ou seja, o período em que podem estar expostos a estes inseticidas, pois tanto o bovino quanto os

peixes estes períodos podem passar de anos, enquanto que para os frangos, em média, dificilmente ultrapassam 2 meses de vida. Isto é, quanto maior o ciclo de produção desses animais, maior será o tempo de exposição a estes inseticidas e maior a probabilidade de acumulação dos mesmos.

A correlação foi negligenciável nas amostras de ovos. Neste caso, é importante salientar dois fatores: 1- a galinha tem que ter sido exposta no período de formação do ovo, 2 – a baixa variação no teor de lipídios nos ovos. Para as amostras de leite, não houve correlação, mesmo apresentando uma alta variação no teor de lipídios. A quantidade de piretróides e CLO no leite está intimamente relacionada com o tempo passado entre a aplicação e a ordenha, assim como a dose aplicada. Cabe salientar que um nível basal pode ocorrer devido à bioacumulação na gordura do animal. A presença desses inseticidas no leite é oriunda da excreção via glândulas mamárias, uma vez que o leite é rico em lipídios facilitando a eliminação de compostos lipofílicos por esta via.

6.1.2 Análises da clara e gema segregadas

Os ovos apresentam duas partes bem distintas, uma rica em proteínas que é a clara e outra rica em lipídios que é gema. Cinco amostras de ovos foram analisadas de forma separadas. Como é possível observar na **Tabela 5** os piretróides BIF, CIA e CIP foram quantificados na faixa de $0,01 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $2,58 \mu\text{g kg}^{-1}$ na gema, enquanto que na clara os valores de concentração ficaram abaixo do LQ.

Tabela 5. Resultados positivos para a concentração de piretróides (BIF, CIA e CIP) em ovos com segregação entre clara e gema ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

Piretróides	Amostras									
	C1	C2	C3	C4	C5	G1	G2	G3	G4	G5
Bifentrina	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,02	0,02	0,10	0,03	0,03
Cialotrina	nd	nd	<LQ	<LQ	nd	nd	nd	0,03	0,04	nd
Cipermetrina	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,58	0,03	0,01	0,01	0,02

C – Clara de ovo (0,3 g de amostra liofilizada); G – Gema de ovo (0,1 g de amostra liofilizada); nd – não detectado

Na **Figura 18**, é apresentada uma imagem da sobreposição de cromatogramas da cipermetrina e bifentrina de ovos onde houve segregação das partes.

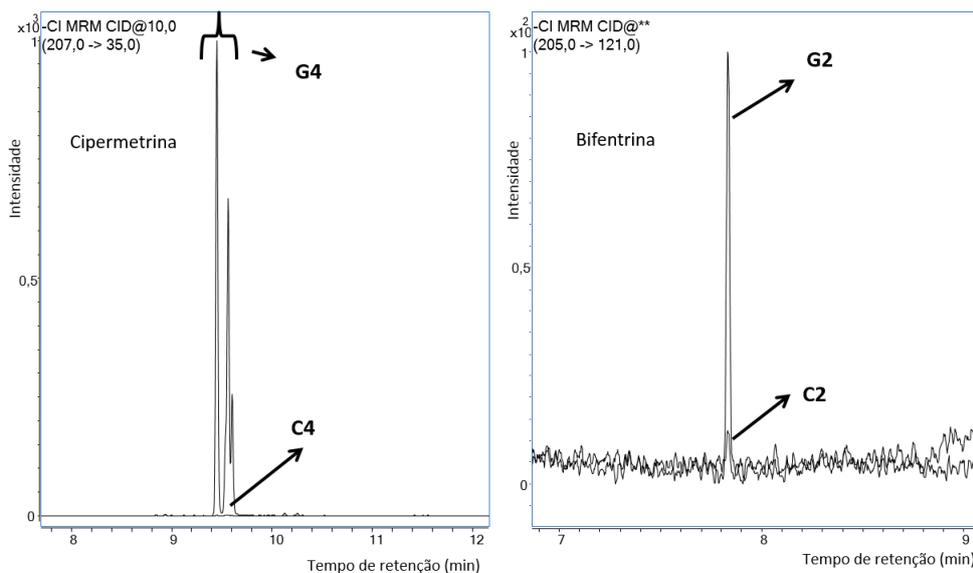


Figura 18. Cromatogramas sobrepostos referentes às transições m/z 207-35 da cipermetrina (ovo 4) e m/z 205-121 da bifentrina (ovo 2) oriundos de análises separadas de clara (C) e gema (G).

Os ovos se desenvolvem no ovário da galinha durante um período que varia de dias a semanas. É durante este processo que os piretróides podem ser incorporados aos ovos. De acordo com os resultados existe um indicativo de acumulação dos piretróides na gema do ovo, que é a fração lipofílica. Segundo Kan¹⁴⁵, os medicamentos veterinários também podem se distribuir entre a clara e a gema.

6.2 MÉTODO ANALÍTICO

6.2.1 Cromatografia a Gás com Ionização Química no modo Negativo acoplado a Espectrometria de Massa em *tandem*

A maioria dos piretróides apresentam no mínimo dois centros quirais, resultando em um elevado número de isômeros para cada molécula. A utilização da cromatografia como método instrumental de separação pode distinguir alguns destes isômeros. Para a permetrina (Tipo I) sem o grupo ciano com dois carbonos quirais foi possível separar os diastereoisômeros *cis/trans*, com a coluna DB-5-MS, porém para a ciflutrina e cipermetrina ambas do Tipo II e com três carbonos quirais, a separação não atingiu uma resolução aceitável entre os quatro diastereoisômeros. Com a utilização da coluna de fase estacionária quiral (BetaDexTM-325) foi possível aumentar a resolução e então separar os diastereoisômeros (Figura 19).

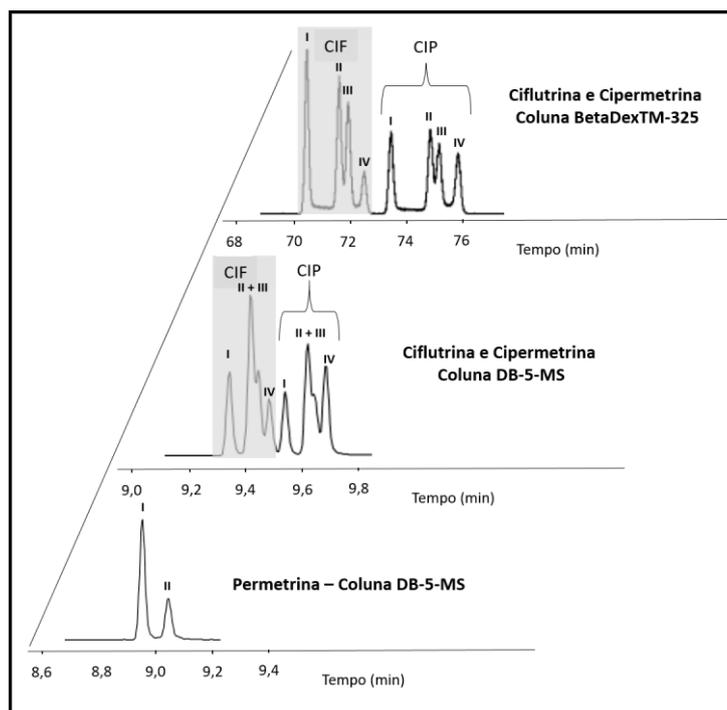


Figura 19. Representação do cromatograma da permetrina, ciflutrina (CIF) e cipermetrina (CIP) utilizando diferentes colunas, e evidenciando os isômeros *cis* (I e III) e isômeros *trans* (II e IV).

Neste trabalho, a resolução alcançada na separação dos diastereoisômeros da ciflutrina e cipermetrina foi suficiente para avaliar o perfil isomérico de cada uma delas. Corcellas e colaboradores¹²² conseguiram separar os diastereoisômeros da cipermetrina e separar os enantiômeros dos picos *cis* (I e III) em quatro picos utilizando uma coluna BGB-172 da *BGB Analytik*.

Além da grande quantidade de isômeros, os piretróides são extremamente lábeis, ou seja, sofrem grande fragmentação na fonte quando a ionização ocorre por impacto eletrônico, o que leva a perdas de informações relacionadas ao íon molecular. Devido à isso, a ionização química no modo negativo (NCI) é uma alternativa mais adequada. O espectro de massa NCI-MS dos piretróides é geralmente caracterizado por picos intensos formados pela perda dos substituintes éster formando íons carboxilato estáveis. Para a aquisição no modo MRM do triplo quadrupolo, a energia de colisão foi variada para obter o “íon produto” de maior intensidade. As energias de colisão otimizadas estão descritas no **Apêndice D** (página 89), para cada piretróide e para o clorpirifós. Na **Figura 20** está representado um esquema do que ocorre com o piretróide cipermetrina desde a chegada dele na fonte até o detector.

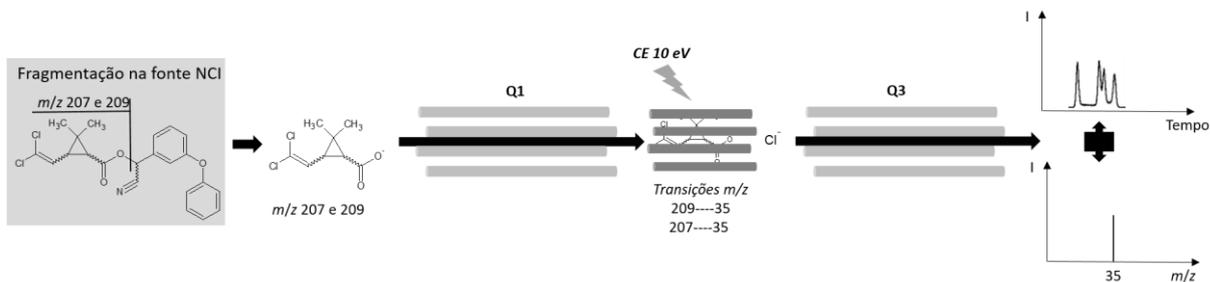


Figura 20. Representação do modo de aquisição MRM no espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo para o piretróide cipermetrina.

A vantagem de utilizar o modo MRM em um espectrômetro de massa do tipo triplo-quadrupolo em *tandem* é a alta sensibilidade obtida para ensaios quantitativos multi-analitos. Na utilização de padrões marcados, é fundamental a escolha dos íons precursores que contenham a marcação isotópica.

6.2.2 Etapa de Extração e *Clean up*

A extração foi realizada utilizando ultrassom e centrifugação e será discutida no capítulo 6.2.3 juntamente com o tema recuperação. O ultrassom é fundamental na extração dos inseticidas das matrizes liofilizadas, pois proporciona um maior contato entre a matriz e o solvente devido ao aumento da pressão que favorece a penetração e o transporte, já a temperatura favorece a solubilidade e a difusão. A etapa de centrifugação vai separar a fração sólida (rica em proteínas) da fração líquida onde estão os inseticidas e os lipídios (**Apêndice E**, página 90).

Nesta etapa, se torna imprescindível a remoção dos ácidos graxos, triglicerídeos, tocoferóis, colesterol e seus ésteres. Estes compostos lipofílicos acabam interferindo no desempenho analítico caso não sejam removidos. Um *clean up* ineficiente nestas matrizes complexas pode acarretar em um acúmulo destes componentes não voláteis no *liner* e na coluna, formando novos sítios ativos, podendo diminuir a resposta do analito. Hildmann e colaboradores¹²⁰ apresentaram uma estimativa da remoção de gorduras em amostras de ovos extraídas por cromatografia de permeação em gel (GPC) utilizando diferentes processos de *clean up* (carbono negro grafitado, C18 e PSA). A utilização do adsorvente C18 demonstrou bons resultados na remoção do tocoferol, triglicerídeos, colesterol e ésteres do colesterol, enquanto que o PSA foi mais adequado para a remoção dos ácidos graxos¹²⁰. Bons resultados de *clean up* também foram alcançados por Corcellas e colaboradores em leite¹³ e em peixe¹²

utilizando cartuchos de C18 e alumina básica em *tandem*, mesmo procedimento utilizado neste trabalho (**Apêndice F**, página 91). A pequena quantidade de amostra utilizada é outro fator que colaborou para um *clean up* mais eficiente, uma vez que diminui a probabilidade de saturação das fases por lipídios. Transformando as quantidades liofilizadas utilizadas para peso úmido os valores variaram de aproximadamente 1,3 g para músculo bovino e de peixe, 1,2 g para músculo de frango, 0,8 mL para o leite e 0,4 g para os ovos, valores estes, inferiores aos encontrados na literatura como 10 g de músculo bovino^{125; 146} e de músculo de frango¹¹⁴, 5 g de músculo bovino e de frango¹²⁶, 5 g de músculo de peixe¹¹³, 5 g de ovos¹²⁰, 5 mL de leite¹¹⁵. É importante salientar que o solvente ACN utilizado para ressuspender o extrato, tem menor capacidade de solubilizar coextratos lipídicos, quando comparados a solventes orgânicos mais apolares, o que também colaborou para uma etapa de *clean up* mais eficiente.

6.2.3 Recuperação

Uma das formas mais eficazes de normalizar a perda dos analitos na extração e *clean up* é a utilização de padrão interno marcado. A recuperação foi determinada em dois níveis de fortificação (1 e 5 ng) em 0,300 g das matrizes de frango, bovino e peixe e 0,100 g em leite e ovos liofilizadas. Os dados de recuperação e DPR para cada um dos 17 piretróides e para o clorpirifós estão apresentados no **Apêndice G** (página 92). Na **Figura 21** é possível observar os valores médios de recuperação.

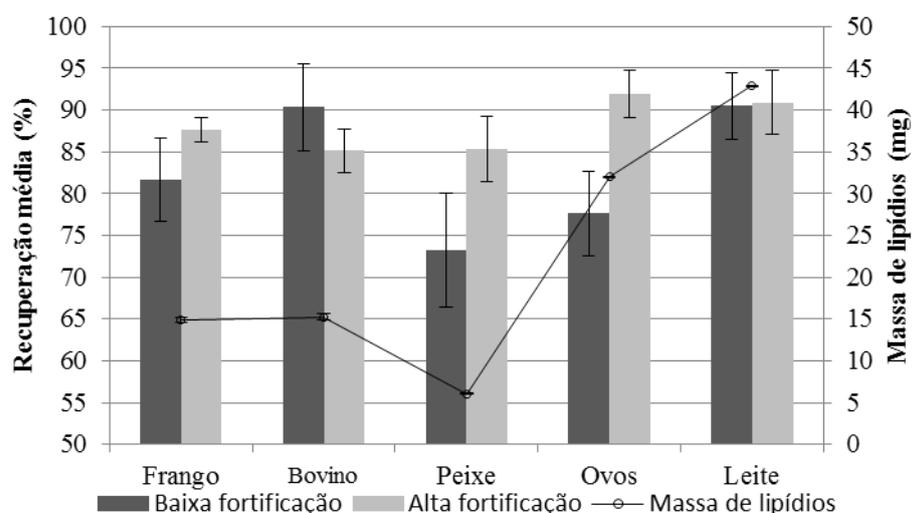


Figura 21. Recuperação média para todos os inseticidas avaliados nos níveis de fortificação (1 e 5 ng), massa de lipídios e a barra de erros expressa em desvio padrão nas diferentes matrizes.

No controle nível de fortificação baixo as recuperações variaram de 27 a 113% enquanto que, no nível mais alto de fortificação as recuperações ficaram entre 55 a 128%. Os DPRs ficaram abaixo de 20%, porém a maioria deles abaixo de 10%, com valores médios de 6,6 e 3,4% para os níveis de baixa e alta fortificação, respectivamente.

Transflutrina (TRA) e o clorpirifós (CLO) apresentaram valores de recuperação abaixo de 50% nas matrizes de frango e peixe para o baixo nível de fortificação. A TRA apresentou os resultados de recuperação mais baixos variando de 41% em peixe a 64% em músculo bovino, porém o pior resultado foi o clorpirifós em músculo de peixe, com uma recuperação de apenas 27%. De acordo com a literatura^{147; 148} quando ocorre uma forte interação entre moléculas pequenas como os agrotóxicos e proteínas, pode haver um decréscimo na extração destes compostos em matrizes proteicas. Isto pode ser um indicativo para a baixa recuperação no músculo de peixe. A resmetrina (RES) e flumetrina (FLU) apresentaram valores de recuperação acima de 120% (125 e 128%, respectivamente).

Os melhores resultados de recuperação em baixo nível de fortificação foram no músculo bovino seguido por leite, ovos, músculo de frango e de peixe. Estas matrizes apresentam diferentes teores de gordura, por exemplo, leite e ovos apresentam grande quantidade de gordura, porém os piores resultados foram constatados na matriz de peixe. Isto pode ser um indicativo de que o teor de gordura não impacta a recuperação na comparação entre estas matrizes.

Para um nível de significância de 0,05, utilizando ANOVA *one-way*, foram observados diferenças nos resultados de recuperação para as diferentes matrizes avaliadas. Devido às matrizes apresentarem diferenças em suas composições, esse era um resultado esperado.

Os inseticidas CLO e TRA em peixe e RES e FLU no leite não foram validados, devido aos resultados de recuperação. Os limites de recuperação adotados foram de 48% – 120%, extrapolando os valores de 70% a 120% do guia SANCO¹³⁷. Esta extrapolação pode ser justificada pelo fato de que neste trabalho foram utilizados padrões internos marcados e fortificações em baixas concentrações. Segundo o guia da SANCO os testes de recuperação podem ser omitidos quando a abordagem utiliza diluição isotópica com o padrão interno marcado com os isótopos sendo adicionados à porção antes da extração. Porém neste trabalho foram utilizados apenas três padrões marcados, e dessa forma os testes de recuperação foram realizados, bem como foram estabelecidos os limites entre 48% – 120% de recuperação.

No comparativo dos resultados de recuperação com outros métodos de extração/*clean up* publicados, como em bovino-ASE-SPE¹⁴⁶; peixe-MSPD¹⁴⁹ e QuEChERS¹¹³; frango- QuEChERS¹¹⁴; ovos-L-L-SPE¹¹⁶ e GPC-MSPD¹²⁰; leite QuEChERS¹¹², MSPD¹⁵⁰ e L-Lcong.¹¹⁵, os resultados obtidos neste trabalho foram bem similares (**Figura 22**). O diferencial deste trabalho foram os bons resultados alcançados a níveis de fortificação inferiores aos utilizados nos outros métodos.

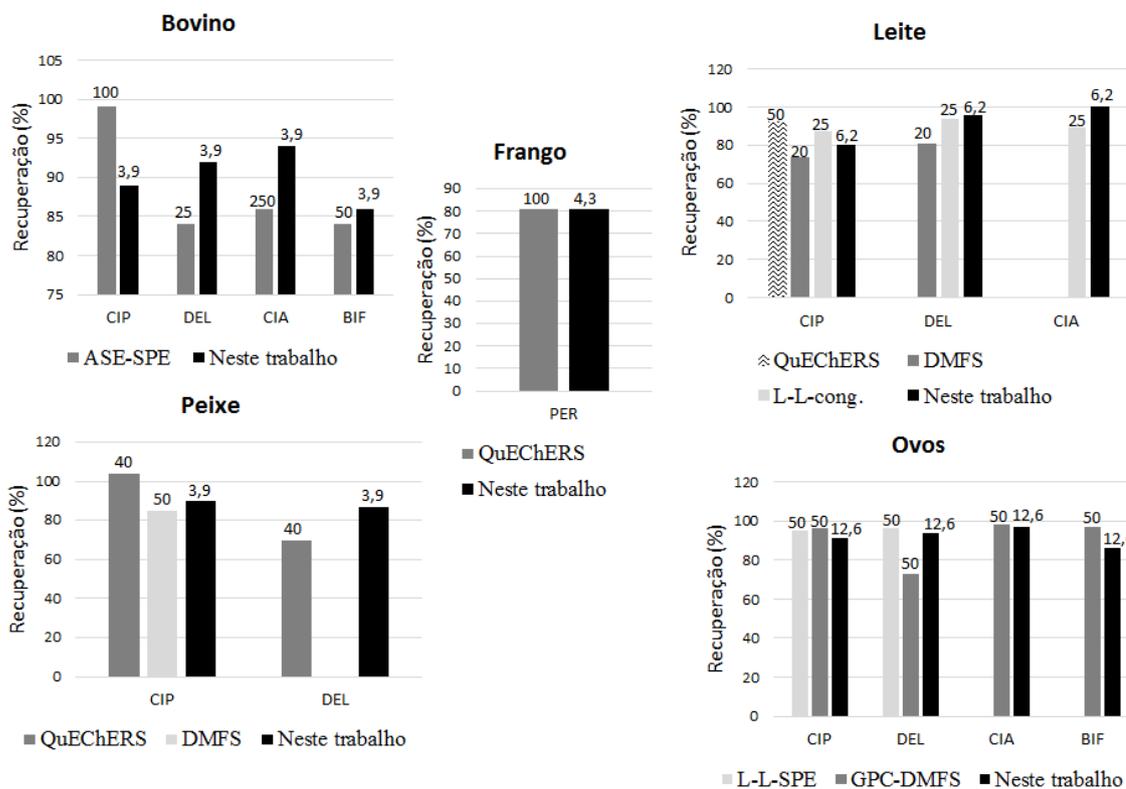


Figura 22. Comparativo dos resultados de recuperação entre diferentes métodos de extração/*clean up* publicados e o aplicado neste trabalho. Sobre as barras estão os níveis de fortificação em $\mu\text{g kg}^{-1}$.

6.2.3.1 Recuperação avaliando o perfil isomérico

O perfil isomérico foi avaliado nos testes de recuperação dos piretróides nos diferentes tipos de matriz, utilizando o FI para cada par de isômeros calculado pela equação 1 (página 36). Os isômeros com um sinal inferior a 3% da área de seu par foram descartados. Foi utilizada uma tolerância de $\pm 0,1$ nos valores do FI. Desta forma, tomou-se por base que valores de FI entre 0,9 e 1,1 não apresentaram mudança na proporção de isômeros nos ensaios de recuperação. Em torno de 82% dos resultados de recuperação o FI variou de 0,9 a 1,1, apresentando baixa variação na proporção dos isômeros. Entre os piretróides que apresentaram uma variação superior a esta faixa, houve uma predominância do primeiro isômero (*cis* – na maioria dos casos) nas diferentes matrizes (**Figura 23**).

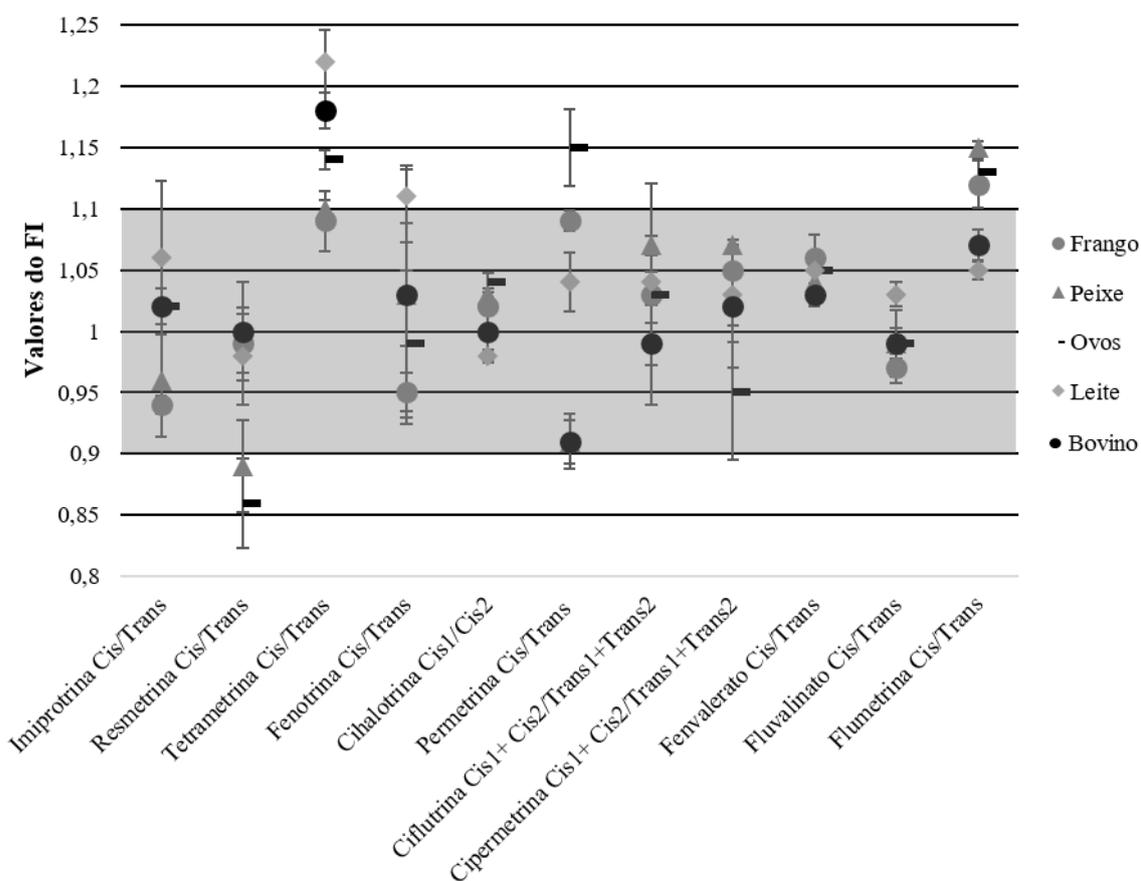


Figura 23. Valores do FI para os piretróides imiprotrina, resmetrina, tetrametrina, fenotrina, cihalotrina, permetrina, ciflutrina, cipermetrina, fenvalerato, fluvalinato e flumetrina com barras de erros representando o desvio padrão.

As maiores variações de FI ficaram por conta da tetrametrina (FI com valores entre 1,09 – 1,22) e flumetrina (FI com valores entre 1,05 – 1,15). Nos dois casos houve predominância do primeiro isômero em todas as matrizes. A tabela com todos os valores de FI está apresentada no **Apêndice H** (página 93). Avaliando estes ensaios de recuperação, as evidências apontam para um predomínio do isômero *cis* para alguns piretróides. Estas informações do FI são fundamentais para discutir os resultados em amostras reais, no quesito da bioacumulação, biodegradação e biotransformação que podem acontecer de forma seletiva entre os isômeros.

6.2.4 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi realizada no modo intralaboratorial, em uma série de 5 experimentos para cada matriz em dias alternados. O nível de fortificação foi de 1 ng de

piretróides e clorpirifós em: 0,3 g para as matrizes de músculo bovino, de frango e de peixe; 0,1 g para as matrizes de leite e ovos liofilizados. Os resultados do DPR ficaram abaixo do critério de 20% (**Apêndice I**, página 94), preconizado pelas normas e guias.

6.2.5 Limites de detecção e quantificação

A eficiência do *tandem* de cartuchos de alumina básica e C18 na etapa de *clean up* e a pequena quantidade de amostra utilizada reduziram a extração de interferentes. Isto colaborou para uma diminuição do ruído no cromatograma promovendo melhores LD e LQ. Os valores de LD variaram de 0,06 a 101 ng kg⁻¹ ou ng L⁻¹, já os de LQ ficaram entre 0,19 e 337 ng kg⁻¹ ou ng L⁻¹. Os valores estão relacionados no **Apêndice J** (página 95).

Em torno de 95% dos analitos apresentaram maior limite nas matrizes de ovos ou leite. Houve um maior ruído nestas matrizes, provavelmente, devido ao alto teor de lipídios.

Outro fator que favoreceu a alta sensibilidade foi a utilização do sistema de GC/NCI-MS/MS, que é a técnica instrumental mais indicada para este tipo de análise. Quando comparado a outros métodos, o método proposto é mais sensível, com baixos valores de LQ, chegando a duas ou três ordens de magnitude menor em relação a outros métodos (**Tabela 6**).

Tabela 6. Comparação entre os LQ de estudos similares publicados na literatura científica.

Piretróides	Matriz					
	Leite		Ovos		Músculo bovino	
	LQ					
	Meneghini (115)	Neste estudo µg L ^{-1b}	Souza (27)	Neste estudo ng g ^{-1b}	Stefanelli (146)	Neste estudo µg kg ^{-1b}
BIF			10	0,002	25	0,005
CIA	0,9	0,002			125	0,005
PER 2 ^a	1,2	0,1	20	0,05	100	0,02
CIF 4 ^a	2,2	0,01				
CIP 4 ^a	2,2	0,01	50	0,009	50	0,002
DEL	2,7	0,009	50	0,009	13	0,005
FEN	1,0	0,005			50	0,002

a – número de isômeros neste estudo

b – peso úmido

Os estudos comparados ao presente estudo, utilizaram cromatografia a gás, ionização por impacto eletrônico e analisador de massa quadrupolo linear (MS)^{27; 146} e triplo-quadrupolo (MS/MS)¹¹⁵. Além destes fatores a alta quantidade de amostras utilizadas nesses estudos

como 5 mL de leite¹¹⁵ e 10 g músculo bovino¹⁴⁶ podem ter contribuído para os LQs mais elevados.

Shamsipur e colaboradores¹⁵¹ alcançaram níveis de LD na mesma ordem de magnitude do presente trabalho com valores de 2,6 ng L⁻¹ para DEL, 9,5/30 ng L⁻¹ para *cis/trans* PER e 0,6/1,7 ng L⁻¹ para os dois isômeros do FENV através de um eficiente método de pré-concentração para a matriz de leite e utilizando GC/EI-MS.

6.3 AMOSTRAS REAIS

6.3.1 Quantificação e taxa de detecção

Dentre os inseticidas avaliados apenas o CLO, BIF, CIA, PER, CIP e DEL foram detectados e quantificados. No Brasil, estes 6 agrotóxicos estão registrados no Ministério da Agricultura e autorizados para uso como inseticida⁵³. Os dados referentes aos níveis gerais de contaminação e taxa de detecção podem ser observados no **Apêndice K** (página 97). Já os dados completos de cada amostra estão apresentados no **Apêndice L** (página 99). Na **Figura 24** é possível observar a frequência de ocorrência dos inseticidas nas diferentes matrizes, considerando os valores acima do LD.

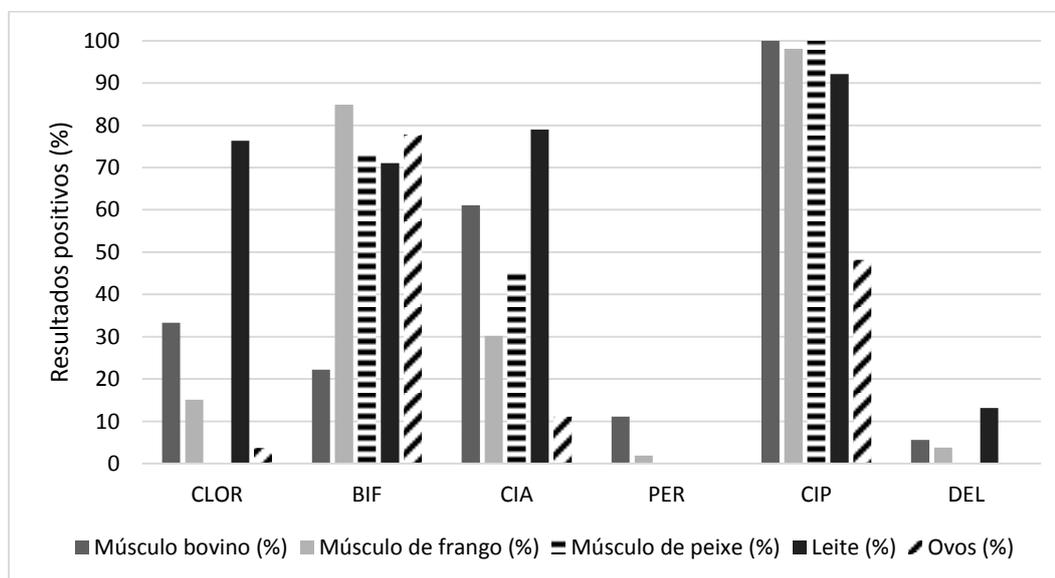


Figura 24. Porcentagem dos resultados positivos acima do LD nas amostras de músculo bovino, de frango, de peixe, ovos e leite.

A CIP foi o inseticida com maior incidência de resultados positivos, estando presente em todas as amostras de músculo bovino e de peixe, em 98% das amostras de músculo de

frango, 92% das amostras de leite e 48% das amostras de ovos. Cabe ressaltar que os piretróides BIF e CIA também apresentaram altas incidências em: frango, peixe, leite e ovos, e bovino e leite, respectivamente. O CLO esteve presente em 76% das amostras de leite. Outros trabalhos também relataram a CIP como o piretróide mais presente nas amostras¹²⁷. A alta incidência de CIP pode estar relacionada com os dados apresentados na **Tabela 1** (página 10), onde a CIP é o ativo com maior número de produtos registrados, quando comparado aos outros inseticidas avaliados neste trabalho.

Os níveis mais altos encontrados foram de CLO com concentrações de $46 \mu\text{g L}^{-1}$ e $18 \mu\text{g kg}^{-1}$ no leite e no músculo bovino, respectivamente e do piretróide CIP com concentrações de $3,4 \mu\text{g kg}^{-1}$, $2,8 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ em músculo bovino, leite e ovos, respectivamente. Outros estudos científicos também têm encontrado resíduos destes inseticidas nestes gêneros alimentícios. Neste trabalho, em ovos, foram detectados os piretróides CIA, CIP e BIF nas concentração de nd – $0,04 \text{ ng g}^{-1}$, nd – $1,37 \text{ ng g}^{-1}$ e nd – $0,06 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente. No Brasil, Souza e colaboradores²⁷ detectaram BIF na concentração de 4 ng g^{-1} , duas ordens de grandeza maior do que encontrado neste trabalho, porém a CIP esteve na mesma faixa de concentração. Nas amostras de leite, a presença de CLO, BIF, CIA, CIP e DEL foram detectados nos intervalos de concentração de nd – $45,67 \mu\text{g L}^{-1}$, nd – $0,11 \mu\text{g L}^{-1}$, nd – $0,28 \mu\text{g L}^{-1}$, nd – $2,75 \mu\text{g L}^{-1}$ e nd – $0,20 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Outros estudos, também realizados no Brasil, detectaram DEL em níveis de $0,25 - 1,45 \mu\text{g L}^{-1}$ e CIP a $1,51 - 3,68 \mu\text{g L}^{-1}$ no leite, ambos nas mesmas ordens de concentração^{115; 121}. Corcellas e colaboradores¹² detectaram CIA, CIP e BIF em peixes selvagens de um rio da Espanha nas concentrações médias de $17,5 \text{ ng g}^{-1}$, 133 ng g^{-1} e $14,1 \text{ ng g}^{-1}$ (peso lipídico), respectivamente, os quais estão um pouco acima das encontradas neste trabalho $0,3 \text{ ng g}^{-1}$, $7,5 \text{ ng g}^{-1}$ e $9,0 \text{ ng g}^{-1}$ (peso lipídico), respectivamente.

Para se fazer uma relação entre a quantidade de inseticida, o tipo de matriz e o tipo de inseticida as quantidades foram relativizadas para 11 amostras, que é o menor número de amostras (**Figura 25**).

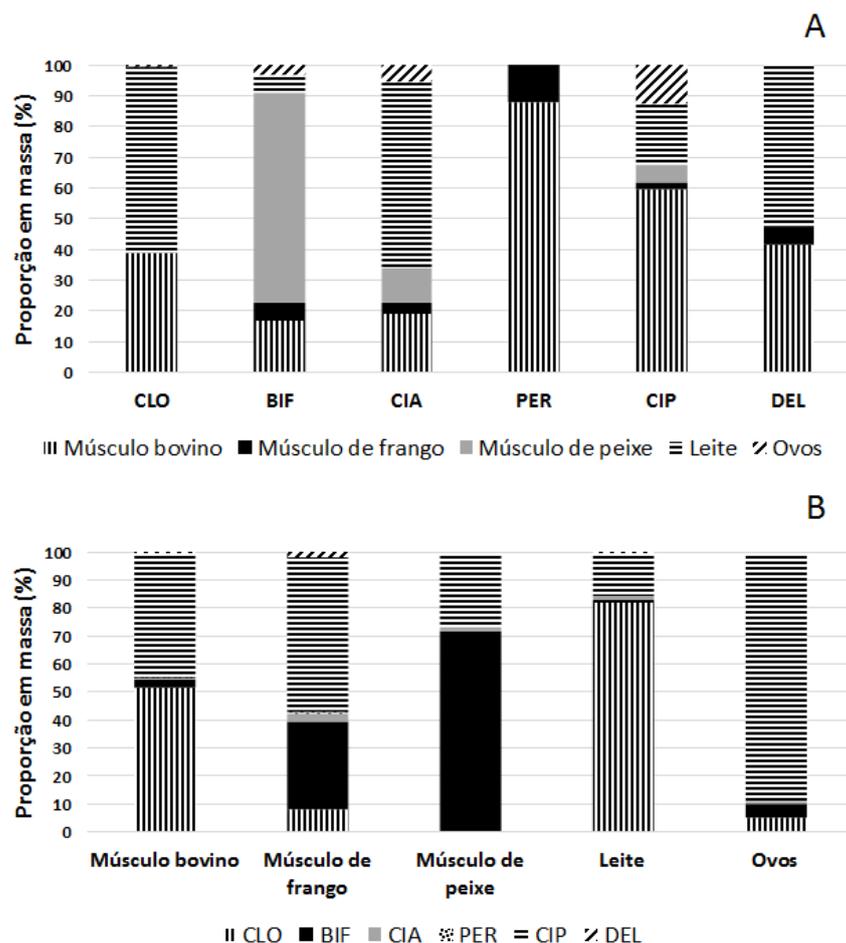


Figura 25. A - Proporção em massa do inseticida específico nas diferentes matrizes, B - proporção em massa dos diferentes inseticidas na matriz específica.

As maiores quantidades de CLO e DEL foram encontradas nas amostras de leite e músculo bovino. Já para a BIF as maiores quantidades foram encontradas nas amostras de peixe, assim como, CIA no leite e CIP no músculo bovino.

Avaliando as matrizes de forma independente, as maiores quantidades de inseticidas no músculo bovino e no leite foram o CLO e a CIP. Nos ovos a CIP foi responsável por mais de 90% da contaminação em massa. No músculo de frango a CIP também foi a principal contaminação seguida da BIF. No músculo de peixe, a BIF foi responsável por mais de 70% do total de resíduos em massa.

Cabe ressaltar a similaridade entre os resultados encontrados no músculo de frango e seu derivado ovo. Nestas duas matrizes a CIP, a BIF e o CLO estavam presentes em maior concentração. É possível fazer a mesma relação entre o músculo bovino e seu derivado, leite, com os inseticidas CLO e CIP. A CIP é largamente utilizada em animais, no Brasil, no

combate ao carrapato (*Boophilus microplus*)¹⁰⁰. Este fato pode ser uma explicação para a incidência de 100% no músculo bovino e 92% no leite. Além da CIP a DEL também é utilizada no combate ao carrapato¹²¹. Nos últimos anos, algumas pragas começaram a desenvolver resistência aos piretróides, desta forma, uma alternativa foi a associação de piretróides a outras classes de inseticidas. Um exemplo desta associação está entre o piretróide CIP e o organofosforado CLO para combater pragas resistentes como o carrapato (*Boophilus microplus*) e a mosca do chifre (*Haematobia irritans*)³⁹, o que corrobora com os níveis predominantes de CIP e CLO no músculo bovino e no leite. Também cabe salientar que dos 38 produtos registrados na Agrolink contendo o ativo CLO, 25 estão em associação com a CIP.

6.3.2 Incidência do número de inseticidas por amostra

De um total de 152 amostras, apenas 4 não apresentaram nenhum nível de contaminação para estes inseticidas, observando o LD do método, sendo as 4 da matriz ovo. A maioria das amostras continha resíduos de mais de um inseticida por amostra (**Figura 26**).

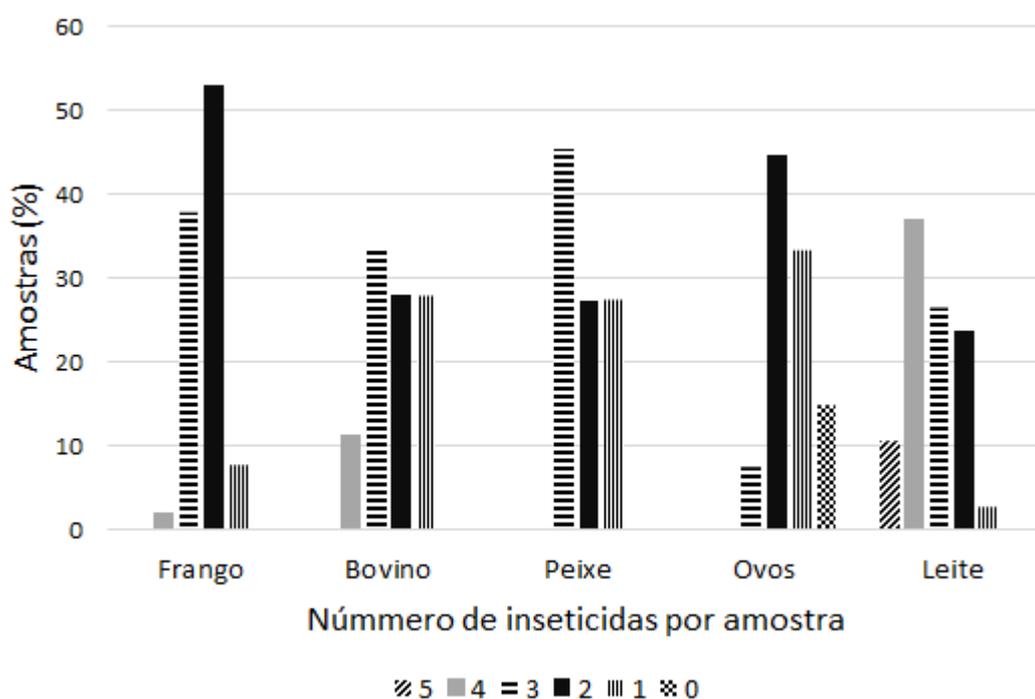


Figura 26. % das amostras e número de inseticidas encontrados em cada amostra expresso em porcentagem do número total de amostras para a matriz específica.

Cerca de 10% das amostras de leite analisadas, estavam contaminadas com 5 inseticidas e cerca de 37% com 4 inseticidas. Nas amostras de frangos, a maioria das amostras estavam contaminadas com 2 a 3 inseticidas. As amostras de músculo bovino e músculo de peixe estavam contaminadas com 1, 2 e 3 inseticidas por amostra e as amostras de ovos foram as que apresentaram o menor número de inseticidas por amostra, em média de 1 a 2. Chung e colaboradores¹²⁷ encontraram a presença de quatro piretróides (CIP, BIF, PER e CIA) simultaneamente em algumas amostras de origem animal. Esta alta incidência pode estar relacionada ao disseminado uso destes inseticidas nas mais variadas áreas. Eles podem estar presentes na alimentação do bovino e do frango, pois são utilizados na armazenagem de grãos, nas pastagens para controle de pragas assim como nos estábulos e galinheiros, além da aplicação direta nestes animais. O sistema de confinamento, principalmente na criação de frangos, facilita a proliferação de pragas e doenças, sendo comum a aplicação de piretróides e CLO, expondo os animais a estes inseticidas. Na Espanha, Alvarez e colaboradores¹⁵² encontraram CLO em ração para bovinos em níveis acima do LMR permitido. Como visto, os bovinos, por exemplo o gado leiteiro, estão expostos a estes inseticidas de diversas formas, podendo acumular nos tecidos, mas principalmente eliminá-los no leite devido ao alto teor lipídico. O alto número de inseticidas por amostra de leite é preocupante, uma vez que o leite é muito consumido nas etapas iniciais da vida. Este ponto é crítico, pois as crianças podem estar altamente expostas a resíduos de inseticidas, além de existir um maior risco de efeitos adversos à saúde devido às suas características fisiológicas.

A descarga agrícola descontrolada de agrotóxicos criou uma preocupação ambiental significativa, uma vez que estes produtos químicos são propensos a se difundirem facilmente neste meio através do escoamento superficial e espalhando-se para todos os ambientes aquáticos. Organismos aquáticos, como peixes, são capazes de acumular em seus tecidos alguns destes contaminantes, como os piretróides e clorpirifós. Cabe ressaltar que na aquicultura, a alimentação dos peixes pode estar contaminada, além da aplicação de inseticidas diretamente na água para o controle de pragas, representa uma exposição direta do peixe. Conseqüentemente, os peixes constituem uma importante fonte de contaminação, tanto para os predadores marinhos superiores como para os consumidores humanos.

A principal preocupação referente ao alto número de inseticidas por amostra está no fato de que pouco se sabe sobre os efeitos sinérgicos e interações destes inseticidas, principalmente quando ingeridos através de resíduos em alimentos.

6.3.3 Aplicação *pour on* de cipermetrina

Grande parte da aplicação de piretróides nos bovinos se dá pelo método *pour on*. Mesmo sendo uma aplicação na parte externa do animal, estes compostos podem ultrapassar a barreira cutânea, justamente por serem lipofílicos, e atingirem a corrente sanguínea do animal. No sangue podem ser biotransformados a compostos mais hidrossolúveis e eliminados na urina. Já em sua forma natural podem ficar acumulados na gordura animal, eliminados na urina e excretados no leite devido ao alto teor de gordura presente no mesmo.

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho é possível inferir que a CIP atravessa a barreira cutânea chegando a corrente sanguínea, passando para o leite através das glândulas mamárias e atingindo seu valor máximo de concentração a 24 horas após a aplicação (**Figura 27**). Mesmo que a maior concentração no leite ($11,06 \mu\text{g L}^{-1}$) esteja abaixo do LMR ($50 \mu\text{g L}^{-1}$), ocorre um contraponto com o informado pelo fabricante do produto, que informa um período de 6 horas entre a aplicação e a próxima ordenha.

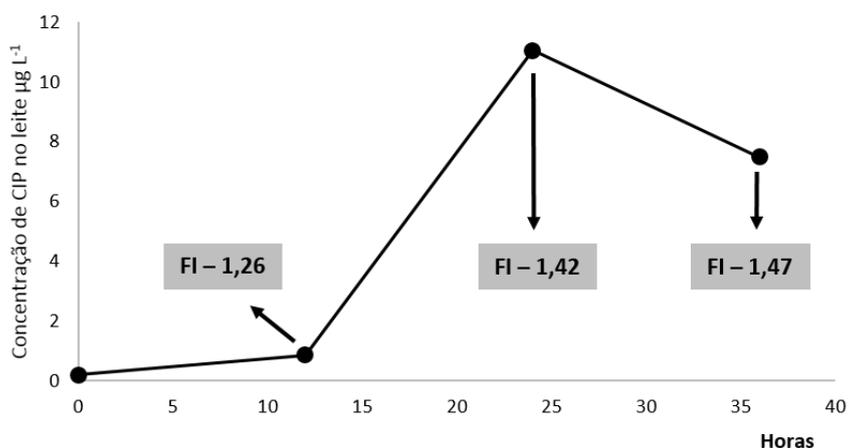


Figura 27. Variação da concentração e valores do fator isomérico (FI) da cipermetrina (CIP) no leite em um animal tratado com CIP via *pour on* em intervalo de 12 h para cada ordenha.

Outro indicativo deste teste preliminar foi identificado através dos valores do FI, que foram aumentando de acordo com o tempo transcorrido após a aplicação, demonstrando maior quantidade do isômero *cis* perante o *trans*. Isto pode ter ocorrido por uma biotransformação preferencial do isômero *trans*. Segundo Mikata e colaboradores⁷² a cipermetrina sofre uma biotransformação preferencial no isômero *trans* em ratos e em humanos. Na **Figura 28** é possível observar um comportamento diferenciado para o isômero

trans 2, o qual não acompanha proporcionalmente o aumento da área do pico cromatográfico quando comparado aos outros isômeros.

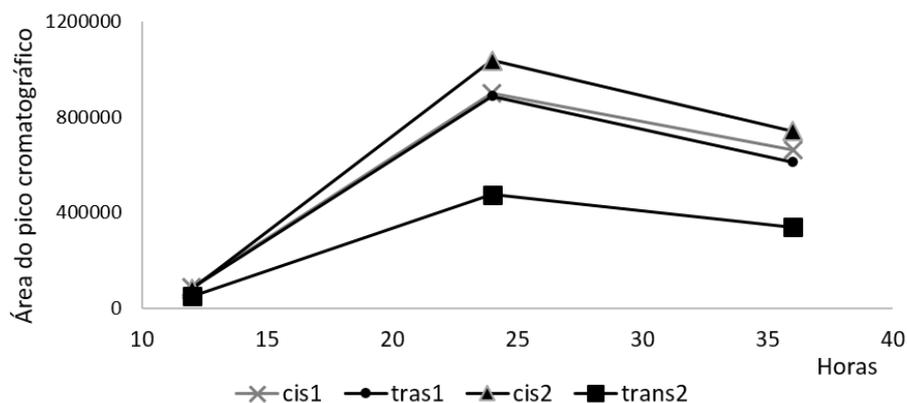


Figura 28. Monitoramento dos picos cromatográficos referentes a CIP para os 4 isômeros (cis1, cis2, trans1, trans2) no leite em um animal tratado com CIP via *pour on*.

6.3.4 Perfil isomérico

O comportamento dos isômeros é um parâmetro importante de ser avaliado, pois podem apresentar efeitos enantioseletivos imprevisíveis em humanos ou organismos não alvos.

Dos seis inseticidas com resultados positivos nas amostras avaliadas, três piretróides (CIP, CIA, e PER) apresentaram isômeros nos respectivos cromatogramas. A fim de averiguar o perfil destes isômeros, calculou-se o FI nas amostras positivas para comparar estes resultados com os obtidos nos testes de recuperação. Devido ao extenso tempo de análise da CIP, o FI foi determinado apenas em algumas amostras (5-músculo bovino, 5-músculo de frango, 5- músculo de peixe, 7-leite e 2-ovos) (**Figura 29**).

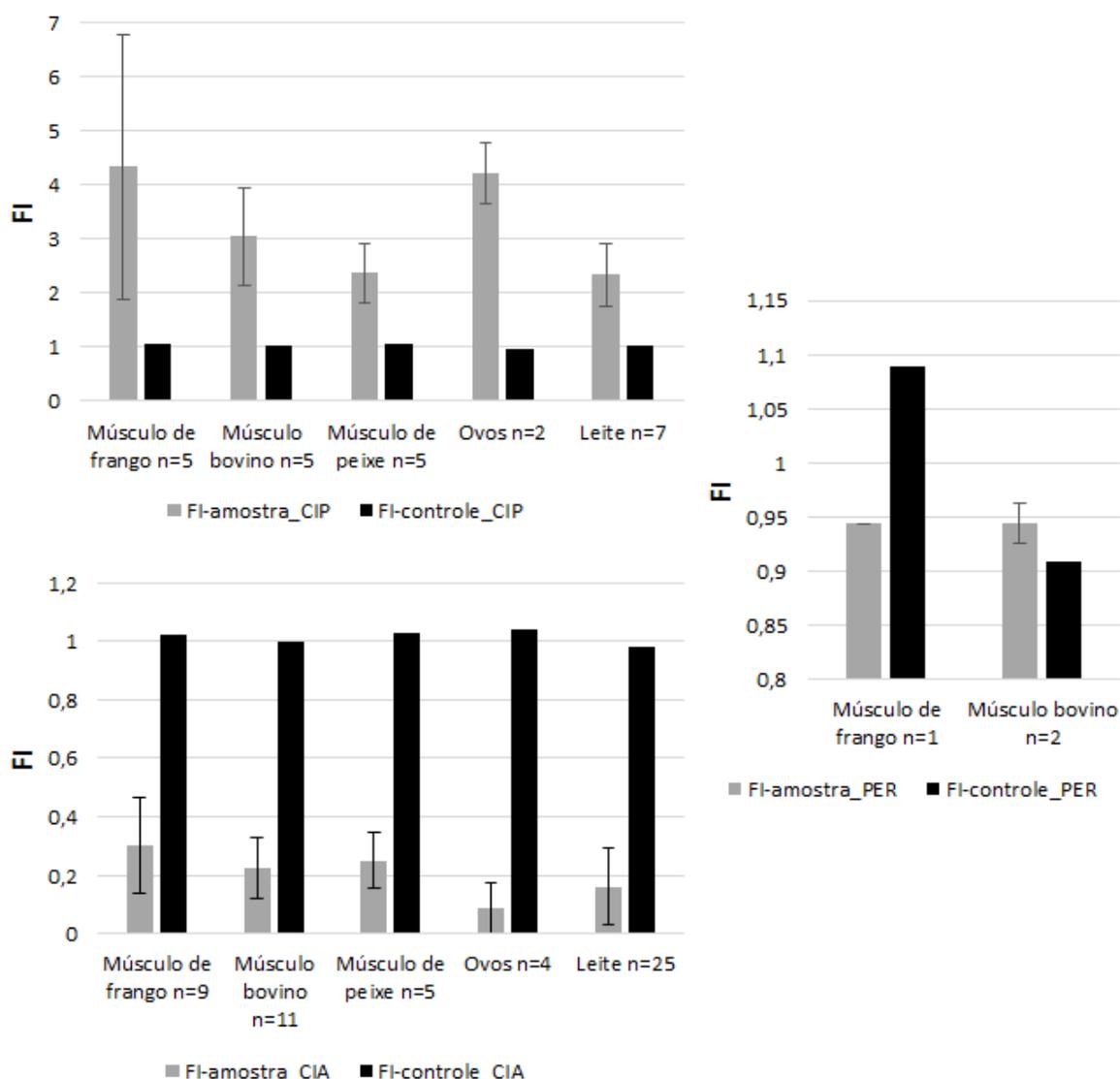


Figura 29. Valores médios do fator isomérico calculados nas amostras positivas comparados com o FI médio calculado nos testes de recuperação (FI-controle), barras representam o DP e o n o número de amostras.

De acordo com os parâmetros do FI definidos neste trabalho é possível inferir que para a PER não houve variação no perfil isomérico nas amostras. Para a CIA houve uma significativa variação. Os valores do FI foram cerca de 20% do valor do controle, demonstrando predominância do segundo isômero, no caso, a λ -CIA. Proporções similares de *cis1/cis2* CIA foram encontradas em leite materno¹²². A λ -CIA tem maior poder inseticida do que seus isômeros, logo as misturas comerciais são enriquecidas com este isômero¹²².

No caso da CIP, o valor médio do FI nas diferentes matrizes foi cerca de três vezes superior ao controle. É importante salientar que a CIP apresenta 4 picos, dois isômeros *cis* e dois *trans* (Figura 30).

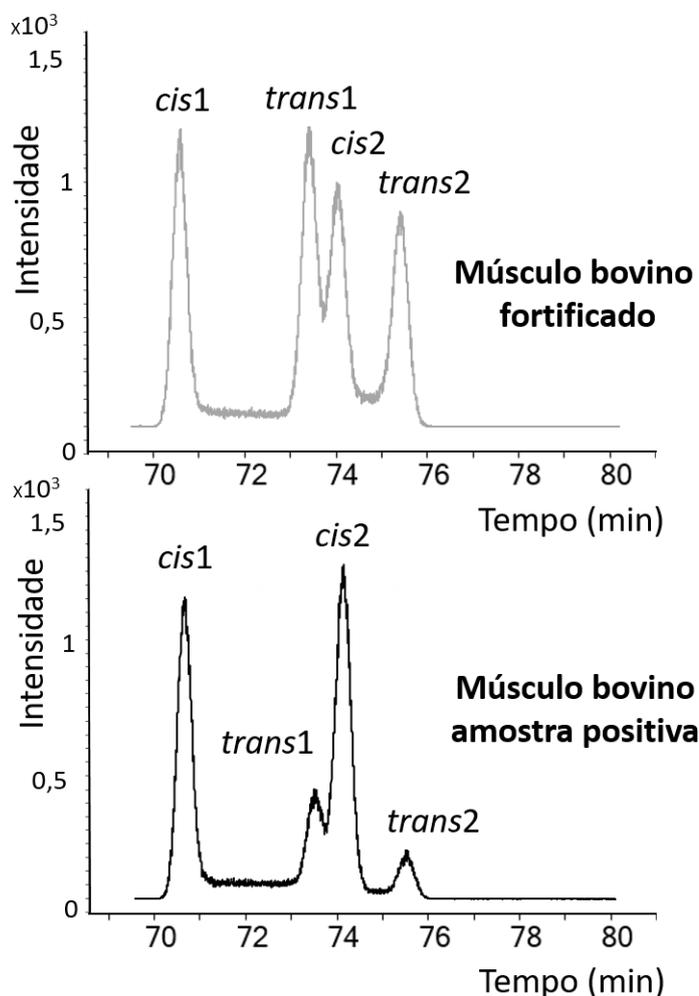


Figura 30. Cromatogramas da CIP (transição m/z 207-35) com 4 sinais, dois com isomeria *cis* e dois *trans* de uma amostra positiva de músculo bovino (preto) e do músculo bovino fortificado com CIP(cinza).

Estes valores de FI acima de 1,0 indicam uma predominância dos isômeros *cis* em todas as matrizes. Corcellas e colaboradores¹² também identificaram uma predominância dos isômeros *cis* em peixes. Uma suposição para tal comportamento é a possível bioacumulação desta forma.

Com o intuito de aprofundar a discussão sobre estes resultados foram analisados 14 produtos comerciais contendo o ativo CIP. Todos os produtos foram adquiridos na mesma unidade federativa da origem das amostras (**Figura 31**).

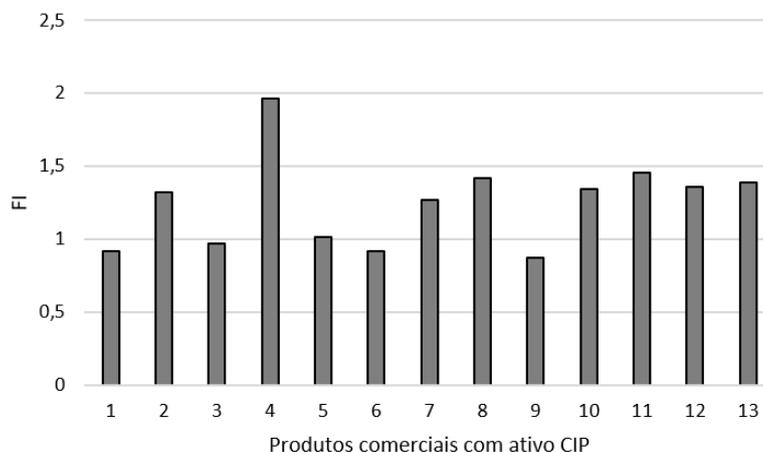


Figura 31. Fator isomérico (FI) da CIP presente em 13 produtos comerciais.

O valor médio do FI para estes 13 produtos foi de 1,24 com desvio padrão de 0,30. O décimo quarto produto comercial, já indicava em seu rótulo um produto enriquecido com o isômero *cis*. Para este produto o valor do FI foi de 6,5. Cabe salientar que a CIP é um dos piretróides mais utilizados, desta forma, existem diversos locais no mundo que realizam a sua síntese. No comparativo entre o valor médio do FI da CIP nos produtos comerciais com os valores de FI nas amostras positivas é possível inferir que possivelmente exista uma bioacumulação preferencial da forma *cis*. Outro fator que corrobora com isto é o fato da biotransformação ocorrer de forma mais rápida nos isômeros *trans*.

O fato dos resultados do FI ter indicado uma maior proporção de isômeros *cis*, aumenta o poder de toxicidade destes resíduos nos alimentos, uma vez que os isômeros *trans* são mais facilmente biotransformados em humanos⁷².

6.4 LIMITES MÁXIMOS DE RESÍDUOS E ESTIMATIVA DA INGESTA DIÁRIA

Recentemente o MAPA incluiu o controle através dos LMRs para todos os inseticidas com resultados positivos abordados neste trabalho em todas as matrizes avaliadas. Esta inclusão ocorreu através da IN-09-PNCRC/animal-2017. Isto traz um avanço para o país, uma vez que demonstra preocupação com os alimentos de origem animal. Se comparado a IN-13 PNCRC/animal-2015, ano em que foram coletadas as amostras deste estudo, apenas 47% das combinações inseticida-matriz estavam incluídas no PNCRC/animal-2015 (**Tabela 7**).

Tabela 7. LMRs estabelecidos pelas IN-13 PNCRC/animal-2015 e IN-09-PNCRC/animal-2017.

	LMRs (mg Kg ⁻¹)									
	MB IN-13	MB IN-09	MF IN-13	MF IN-09	MP IN-13	MP IN-09	O IN-13	O IN-09	L IN-13	L IN-09
<i>cis</i> -Bifentrina	3	3	0,05	0,01	NI	0,01	NI	0,01	NI	0,2
<i>lambda</i> -Cialotrina	0,5	0,5	0,02	0,02	NI	0,01	NI	0,02	0,025	0,2
Cipermetrina	0,05	2	0,05	0,1	NI	0,01	NI	0,01	0,1	0,05
<i>cis</i> -Deltametrina	0,03	0,05	0,03	0,01	NI	0,01	NI	0,02	0,03	0,05
Permetrina	0,05	0,05	0,1	0,1	NI	0,01	NI	0,01	0,05	0,05
Clorpirifós	NI	0,5	NI	0,05	NI	0,01	NI	0,01	NI	0,02

MB-IN-13 - Músculo bovino IN-13 PNCRC 2015

MB-IN-09 - Músculo bovino IN-09 PNCRC 2017

MF-IN-13 - Músculo frango IN-13 PNCRC 2015

MF-IN-09 - Músculo frango IN-09 PNCRC 2017

MP-IN-13 - Músculo peixe IN-13 PNCRC 2015

MP-IN-09- Músculo peixe IN-09 PNCRC 2017

O-IN-13- Ovos IN-13 PNCRC 2015

O-IN-09 - Ovos IN-09 PNCRC 2017

L-IN-13 - Leite IN-13 PNCRC 2015

L-IN-09 - Leite IN-09 PNCRC 2017

NI - Não informado

Houve alguns avanços na IN-09 que normatiza o PNCRC/animal-2017, como a inclusão do controle dos inseticidas (CIP, BIF, CIA, DEL, PER e CLO) nas matrizes ovos e peixes. A inclusão do controle da bifentrina no leite e do clorpirifós em todas as matrizes foi muito importante, uma vez que a BIF estava presente em 71% das amostras de leite e o CLO em 76% delas. Também houve redução nos LMRs da bifentrina e deltametrina em músculo de frango, assim como da cipermetrina no leite. Porém, houve o aumento dos LMRs em 17% das combinações inseticida-matriz. Nenhuma não conformidade foi relatada nos PNCRC/animal 2015 e 2016, considerando apenas os inseticidas e as matrizes avaliadas neste trabalho.

No **Apêndice A** (página 80) é possível observar diferenças nos valores de LMRs entre os diferentes órgãos reguladores. Esta diferença se deve aos fatores que determinam os LMRs. São eles: risco tóxico dos compostos, quantidades passíveis de estarem presentes e os métodos analíticos propostos para efeitos de controle e monitoramento⁴⁰. Por exemplo o LMR da deltametrina em músculo bovino varia de 20 µg kg⁻¹ na comunidade europeia para 30 µg kg⁻¹ nos Estados Unidos e Japão e para 50 µg kg⁻¹ no Brasil.

Na análise das 152 amostras, houve apenas uma não conformidade, no que diz respeito ao LMR legalmente permitido no alimento para consumo humano. O inseticida CLO foi quantificado no leite a uma concentração 2 vezes superior ao LMR estabelecido na IN-09-

PNCRC/animal-2017. A taxa de 0,65% de não conformidades é baixa, porém não se pode desprezar, uma vez que a toxicidade destes inseticidas não é negligenciável.

Muitos produtos químicos, particularmente os agrotóxicos lipofílicos, podem bioacumular em alimentos de origem animal resultando em exposição humana durante o consumo destes alimentos. Cabe salientar, que os alimentos de origem animal podem contribuir com mais de 90% da exposição humana a contaminantes lipofílicos. Neste sentido os valores limites de ingesta diária aceitável (IDA) e a dose aguda de referência (ARfD) colaboram para proteção dos consumidores, uma vez que contemplam a alimentação como um todo, mesmo que seja no modo individual, ou seja, um valor para cada agrotóxico. Neste trabalho foi estimado a ingesta diária de resíduos utilizando a equação 2 (página 37). Estes valores estão expressos na **Tabela 8**.

Tabela 8. Valores estimados da ingesta diária de resíduos de inseticidas, utilizando para cálculo a média das concentrações encontradas e uma estimativa crítica utilizando os valores extremos de concentração e os valores de ingesta diária aceitável.

	CLOR	BIF	CIA	PER	CIP	DEL
EID $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc dia}^{-1}$ (média)	0,0059	0,0010	$7,7 \times 10^{-5}$	$7,2 \times 10^{-5}$	0,0018	0,0003
EID $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc dia}^{-1}$ (casos extremos)	0,052	0,0024	0,00037	$8,6 \times 10^{-5}$	0,024	0,0004
IDA $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc dia}^{-1}$	1	15	5	50	50	10

pc – peso corporal

Estes dados estimados podem estar subestimados devido ao perfil dos consumidores, camada social ou regional, que acabam consumindo uma quantidade maior destes alimentos. Também existe maior sensibilidade nas crianças frente aos agrotóxicos¹⁵³, sendo que elas podem estar mais expostas aos inseticidas do que os adultos. As crianças são grandes consumidoras de leite, ou seja, apresentam maior ingestão proporcional à massa, pois sua massa corporal é menor. Também não se pode excluir o fato das aplicações destes inseticidas dentro das residências, onde mais uma vez as crianças são alvos fáceis destes resíduos pelo contato dérmico e oral. O sistema de biotransformação pode não estar tão desenvolvido quanto ao de um adulto e seu sistema nervoso central estar em pleno desenvolvimento¹⁵⁴, desta forma, são mais suscetíveis aos efeitos tóxicos. Liu e colaboradores⁸³ detectaram o metabólito do inseticida CLO na urina de 70% das crianças de regiões agrícolas da China, de um total de 364 crianças.

O valor do EID pode estar superestimado, pois os processos de aquecimento (cozimento) do alimento e até mesmo a incidência de radiação podem degradar estes inseticidas, e não há informações sobre a toxicidade destes produtos de transformação.

Conforme apresentado na seção 6.3.2 há mais de um inseticida por amostra. Isto dificulta basear as conclusões sobre o alimento ser seguro ou não através dos valores dos valores estimados de ingestão diária. Porém, segundo o documento da FAO, o potencial tóxico da presença de mais de um agrotóxico em um determinado alimento é minimizado pela margem aplicada aos valores de IDA, que devem cobrir a possibilidade do sinergismo entre os agrotóxicos¹⁵⁵.

Também foi estimado a ARfD para a amostra de leite que ultrapassou o valor do LMR. O valor foi de $26 \text{ ng kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1}$ para um adulto, inferior ao valor preconizado de $5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1}$, desta forma não acarretando risco de toxicidade aguda nesta concentração. Todavia os efeitos crônicos ocasionados pela ingestão de alimentos contaminados com agrotóxicos ainda não estão bem definidos, havendo evidências crescentes de carcinogenicidade, genotoxicidade e alterações hormonais. A mensuração da toxicidade crônica em concentrações à nível de ultra traços como as encontradas neste trabalho não é uma tarefa fácil. Entretanto esta possibilidade não deve ser descartada.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que foi possível estabelecer uma metodologia analítica, confiável e sensível capaz de determinar 17 piretróides e o clorpirifós em diversos alimentos de origem animal como músculo bovino, músculo de frango, músculo de peixe, leite e ovos. Foram utilizados padrões marcados, extração via EAU, *clean up* utilizando um *tandem* de cartuchos C18 e alumina básica e determinação via GC/NCI-MS/MS. O preparo de amostra, apesar de ser realizado em várias etapas e utilizar uma quantidade razoável de solvente, origina um extrato limpo e concentrado. Esta foi a etapa limitante da análise. Em média, é possível preparar e analisar 12 amostras por dia. Através da combinação destes procedimentos atingiram-se valores de recuperação aceitáveis para a grande maioria dos inseticidas nas diferentes matrizes e confiabilidade analítica pelo uso de padrões marcados. O grande diferencial ficou por conta do bom desempenho da metodologia em cinco matrizes avaliando um elevado número de piretróides. Os baixos limites de detecção e quantificação alcançados se devem ao eficiente processo de *clean up* e a utilização da ionização química no modo negativo, atingindo um LD de 0,06 ng kg⁻¹ para a transflutrina em músculo bovino, de peixe e de frango.

Os inseticidas CLO, BIF, CIA, PER, DEL e CIP foram detectados nas amostras, com destaque para a CIP que esteve presente em 100% das amostras de músculo bovino e de peixe, 98% de frango e 92% de leite.

É possível inferir que estes inseticidas bioacumulam nas gorduras, sendo que os altos níveis de correlação (Spearman), nas amostras de músculo bovino, peixe e frango comprovam isto. Já nos ovos, este acúmulo de inseticidas se dá na gema, por esta ser rica em lipídios. No leite não houve correlação, os inseticidas são eliminados no leite devido ao alto teor de lipídios deste. Por exemplo, a CIP aplicada *pour on* no bovino acaba ultrapassando a barreira cutânea atingindo assim, a corrente sanguínea do animal, podendo ser excretado na urina ou como comprovado neste trabalho, ser eliminada no leite, justamente pelo seu teor de lipídios.

A avaliação do fator isomérico desenvolvido neste trabalho foi útil para monitorar o perfil dos isômeros nos testes de recuperação, nas amostras com resultados positivos e em produtos comerciais. Houve um predomínio dos isômeros *cis* para TET e FLU nos testes de recuperação. Nas amostras os valores do FI confirmaram um predomínio da λ -CIA e dos isômeros *cis* para a CIP. A biotransformação preferencial dos isômeros *trans* pode ser uma explicação para maior bioacumulação dos isômeros *cis*.

Apenas uma amostra apresentou concentração acima do LMR, porém não ofereceu risco tóxico agudo devido ao valor estimado de ARfD estar abaixo do preconizado. Também os valores de EID foram inferiores aos valores de IDA para todos inseticidas.

A ampla aplicação destes inseticidas nas mais variadas áreas pode ser uma explicação para a alta incidência nas amostras. Um dos agravantes identificados neste trabalho foi a presença de mais de um inseticida por amostra. Mesmo ponderando o fato das baixas concentrações, se torna difícil projetar uma toxicidade crônica mediante tantas possibilidades de sinergismo entre os inseticidas em uma ação crônica ao ser humano.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No Brasil e no mundo a produção de alimentos é feita em larga escala e na dependência do uso de agrotóxicos. A lógica da produção e do mercado dificilmente abre espaço para outra forma de produção. Porém já existem modelos que apresentam alternativas a esta lógica, como a produção de alimentos no sistema agroflorestal, cultivos orgânicos e manejo integrado de pragas, estes modelos além de fornecer alimentos livres de agrotóxicos também protegem o meio ambiente. A Dinamarca é um exemplo nesta área, e no quesito de produtos orgânicos é líder mundial. Pretende dobrar a produção até 2020, projetando para o futuro uma produção 100% livre de agrotóxicos¹⁵⁶. No Brasil, o número de cultivos orgânicos tem apresentado um crescimento considerável nos últimos anos, se consolidando como um grande produtor e exportador de alimentos orgânicos.

No que tange a metodologia apresentada neste trabalho, é de extrema relevância para o país, com possibilidade de aplicação nos LANAGROs no intuito de controlar e prever os níveis (ultra traços) de resíduos de piretróides e clorpirifós em alimentos.

9 REFERÊNCIAS

- 1 PRATES, C. B.; GEBARA, S. S.; RE-POPPI, N. Analysis of organochlorine pesticides in water using headspace solid phase microextraction with gas chromatography and mass spectrometry. **Quimica Nova**, v. 34, n. 7, p. 1260-1264, 2011.
- 2 Global Pesticides Research and markets <http://www.researchandmarkets.com/reports/3338864/global-pesticide-market-by-regions-and-vendors>. (acessado 14/03/2017).
- 3 Ministério do meio ambiente <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. (acessado 14/10/2016).
- 4 Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA. http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/boletim%20de%20comercializacao_2000_2012.pdf. (acessado 30/10/2016).
- 5 GALLI, A. et al. Electroanalytical techniques for the determination of pesticides in foods. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, Jan-Feb 2006.
- 6 TURUSOV, V.; RAKITSKY, V.; TOMATIS, L. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, persistence, and risks. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 2, p. 125-128, Feb 2002.
- 7 CASTILLO, M.; GONZALEZ, C.; MIRALLES, A. An evaluation method for determination of non-polar pesticide residues in animal fat samples by using dispersive solid-phase extraction clean-up and GC-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 5, p. 1315-1328, May 2011.
- 8 NERO et al. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 27: 201-204 p. 2007.

- ⁹ PETROPOULOU, S. S. E.; TSARBOPOULOS, A.; SISKOS, P. A. Determination of carbofuran, carbaryl and their main metabolites in plasma samples of agricultural populations using gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, n. 8, p. 1444-1456, Aug 2006.
- ¹⁰ FEO, M. L.; ELJARRAT, E.; BARCELO, D. A rapid and sensitive analytical method for the determination of 14 pyrethroids in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 15, p. 2248-2253, Apr 9 2010.
- ¹¹ MA, G.; CHEN, L. Development of magnetic molecularly imprinted polymers based on carbon nanotubes - Application for trace analysis of pyrethroids in fruit matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1329, p. 1-9, Feb 14 2014.
- ¹² CORCELLAS, C.; ELJARRAT, E.; BARCELO, D. First report of pyrethroid bioaccumulation in wild river fish: A case study in Iberian river basins (Spain). **Environment International**, v. 75, p. 110-116, Feb 2015.
- ¹³ CORCELLAS, C. et al. Pyrethroids in human breast milk: Occurrence and nursing daily intake estimation. **Environment International**, v. 47, p. 17-22, Oct 15 2012.
- ¹⁴ World Health Organization-WHO. <http://www.who.int/topics/pesticides/en/>. <http://www.who.int/topics/pesticides/en/>, (Acessado 11/10/2016).
- ¹⁵ Thomson Reuters - www.webofknowledge.com. (Acessado 01/2017).
- ¹⁶ ABAD, F. C. et al. Multiresidue Determination of Pesticides in Carrots using Pressurized Liquid Extraction and Gas Chromatography with Mass Spectrometry Detector. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 3, p. 461-468, 2010 2010.

- 17 ANDRADE, G. C. R. M. et al. Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry and dynamic multiple reaction monitoring method for determining multiple pesticide residues in tomato. **Food Chemistry**, v. 175, p. 57-65, May 15 2015.
- 18 BEDENDO, G. C.; SALES FONTES JARDIM, I. C.; CARASEK, E. Multiresidue determination of pesticides in industrial and fresh orange juice by hollow fiber microporous membrane liquid-liquid extraction and detection by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 88, p. 573-580, Jan 15 2012.
- 19 CARNEIRO, R. P. et al. Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS analysis. **Food Control**, v. 33, n. 2, p. 413-423, Oct 2013.
- 20 COSTABEBER, I. et al. Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) in meat and meat products from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 1, p. 1-7, Jan 2006.
- 21 MENEZES FILHO, A.; DOS SANTOS, F. N.; DE PAULA PEREIRA, P. A. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. **Talanta**, v. 81, n. 1-2, p. 346-354, Apr 15 2010.
- 22 HECK, M. C. et al. Estimation of children exposure to organochlorine compounds through milk in Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 288-294, 2007 2007.
- 23 KOLBERG, D. I. et al. Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC-MS. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1436-1442, Apr 14 2011.

- ²⁴ LAVANDIER, R. et al. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and Polybrominated Diphenyl ethers (PBDEs) in three fish species from an estuary in the southeastern coast of Brazil. **Chemosphere**, v. 90, n. 9, p. 2435-2443, Mar 2013.
- ²⁵ RISSATO, S. R. et al. Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1719-1726, 2007.
- ²⁶ DOS SANTOS, G. M. A. D. A. et al. Pesticide residues in conventionally and organically grown tomatoes in espirito santo (brazil). **Quimica Nova**, v. 38, n. 6, p. 848-851, Jul 2015.
- ²⁷ DOS REIS SOUZA, M. R. et al. Validation of a matrix solid phase dispersion (MSPD) technique for determination of pesticides in lyophilized eggs of the chicken *Gallus gallus domesticus*. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 395-401, Sep 2013.
- ²⁸ RIZZETTI, T. M. et al. Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 196, p. 25-33, Apr 1 2016.
- ²⁹ SOUSA, J. D. S. et al. Evaluation of an analytical methodology using QuEChERS and GC-SQ/MS for the investigation of the level of pesticide residues in Brazilian melons. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2675-2681, Dec 1 2013.
- ³⁰ MATSUO, N.; MORI, T. Progress and Future of Pyrethroids. **Pyrethroids From Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide**. 2012.

- 31 FEO, M. L.; ELJARRAT, E.; BARCELO, D. Determination of pyrethroid insecticides in environmental samples. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 692-705, Jul-Aug 2010.
- 32 TSUJI, R.; YAMADA, T.; KAWAMURA, S. Mammal Toxicology of Synthetic Pyrethroids. **Pyrethroids: from Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide**, v. 314, p. 83-111, 2012.
- 33 SCHECHTER, M. S.; GREEN, N.; LAFORGE, F. B. Constituents of pyrethrum flowers .23. cinerolone and the synthesis of related cyclopentenolones. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, n. 9, p. 3165-3173, 1949.
- 34 ALBASEER, S. S. et al. Analytical artifacts, sample handling and preservation methods of environmental samples of synthetic pyrethroids. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 11, p. 1771-1780, Dec 2011.
- 35 YE, J. et al. Enantioselectivity in environmental risk assessment of modern chiral pesticides. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 7, p. 2371-2383, Jul 2010.
- 36 FEO, M. L. et al. Pyrethroid use-malaria control and individual applications by households for other pests and home garden use. **Environment International**, v. 38, n. 1, p. 67-72, Jan 2012.
- 37 MATSUO , N.; MORI , T. Recent Advances of Pyrethroids for Household Use. **Pyrethroids From Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide**. 2012.
- 38 United States Environmental Protection Agency-
<https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/pyrethrins-and-pyrethroids>.(Acessado 22/09/2016).

- 39 GOMES, A.; KOLLER, W. W.; MEDEIROS DE BARROS, A. T. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to acaricides in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Ciencia Rural**, v. 41, n. 8, p. 1447-1452, Aug 2011.
- 40 Codex alimentarius commission.
ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_20e.pdf. (Acessado 20/20/2016)
- 41 (86/362/CEE). Directiva do conselho de 24 de Julho de 1986 relativa a fixação de teores máximos para os resíduos de pesticidas à superfície e no interior dos cereais (86/362/CEE).
- 42 (86/363/CEE). Directiva do conselho de 24 de Julho de 1986 relativa à fixação de teores máximos para os resíduos de pesticidas à superfície e no interior dos géneros alimentícios de origem animal (86/363/CEE).
- 43 (396/2005/CE). Regulamento (CE) N. 396/2005 DO Parlamento europeu e do conselho de 23 de Fevereiro de 2005 relativo aos limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais, de origem vegetal ou animal.
- 44 (149/2008/CE). Regulamento (CE) N. 149/2008 da comissão de 29 de Janeiro de 2008 que altera o Regulamento (CE) n. 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho ao criar os anexos II, III e IV que fixam limites máximos de resíduos para os produtos abrangidos pelo anexo I do mesmo regulamento.
- 45 (839/2008/CE). Regulamento (CE) N. 839/2008 da comissão de 31 de Julho de 2008 que altera o Regulamento (CE) n. 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere aos anexos II, III e IV relativos aos limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície de determinados produtos.

- 46 The acceptable daily intake a tool for ensuring food safety. http://www.pac.gr/bcm/uploads/c2000acc_dai.pdf. (Acessado 22/07/2016).
- 47 Codex Alimentarius International Food Standards. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>. (Acessado 22/11/2016).
- 48 European Commission Pesticides database <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN>. (Acessado 11/10/2016).
- 49 United States Environmental Protection Agency. <https://www.epa.gov/pesticides>. (Acessado 15/11/2016).
- 50 JFCRF- <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html>. (Acessado 15/02/2017)
- 51 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>. (Acessado 15/10/2016).
- 52 (IN-09-PNCRC-2017). <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/pncrc-2017.pdf>. (Acessado 15/04/2017)
- 53 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. (acessado 14/10/2016).
- 54 Agrolink - <https://www.agrolink.com.br/>.(Acessado 17/04/2017).

- 55 Agrolink animal. <https://www.agrolink.com.br/saudeanimal/busca-direta-produto>. (Acessado 17/04/2017).
- 56 Agrolink-fito. <https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/busca-direta-produto>. (Acessado 17/04/2017).
- 57 SODERLUND, D. M. et al. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, n. 1, p. 3-59, Feb 2002.
- 58 REDDY, A. T. V.; AYYANNA, K.; YELLAMMA, K. Sensitivity of brain cholinesterase to cypermethrin toxicity in fresh-water teleost tilapia-mossambica. **Biochemistry International**, v. 23, n. 5, p. 959-962, Mar 1991.
- 59 PHILIP, G. H.; REDDY, P. M.; SRIDEVI, G. Cypermethrin-induced in-vivo alterations in the carbohydrate-metabolism of fresh-water fish, labeo-rohita. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 31, n. 2, p. 173-178, Jul 1995.
- 60 PPDB-Pesticide Properties Data Base.
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/search.htm> (acessado 06/03/2017).
- 61 ZHANG, J. et al. Comparison of the performance of conventional, temperature-controlled, and ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography in analyzing pyrethroid pesticides in honey samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 38, p. 6621-6629, Sep 23 2011.
- 62 GULLICK, D. et al. Determination of deltamethrin in rat plasma and brain using gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 960, p. 158-165, Jun 2014.

- 63 CLARK, J. M.; SYMINGTON, S. B. Advances in the Mode of Action of Pyrethroids. **Pyrethroids: from Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide**, v. 314, p. 49-72, 2012 2012.
- 64 SUN, H. et al. Antiandrogenic activity of pyrethroid pesticides and their metabolite in reporter gene assay. **Chemosphere**, v. 66, n. 3, p. 474-479, Jan 2007.
- 65 SUN, H. et al. Pyrethroid and their metabolite, 3-phenoxybenzoic acid showed similar (anti)estrogenic activity in human and rat estrogen receptor alpha-mediated reporter gene assays. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 371-377, Jan 2014.
- 66 MCCARTHY, A. R. et al. Estrogenicity of pyrethroid insecticide metabolites. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 8, n. 1, p. 197-202, Jan 2006.
- 67 RAY, D. E.; FRY, J. R. A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, n. 1, p. 174-193, Jul 2006.
- 68 DEGUCHI, Y. et al. Mode of Action Analysis for the Synthetic Pyrethroid Metofluthrin-Induced Rat Liver Tumors: Evidence for Hepatic CYP2B Induction and Hepatocyte Proliferation. **Toxicological Sciences**, v. 108, n. 1, p. 69-80, Mar 2009.
- 69 International Agency for Research on Cancer. <https://monographs.iarc.fr/ENG/Publications/internrep/14-002.pdf>. (Acessado 21/09/2016).
- 70 WOOLLEN, B. H. et al. The metabolism of cypermethrin in man - differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. **Xenobiotica**, v. 22, n. 8, p. 983-991, Aug 1992.

- 71 CAPT, A. et al. Comparison of the human skin grafted onto nude mouse model with in vivo and in vitro models in the prediction of percutaneous penetration of three lipophilic pesticides. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 274-287, Apr 2007.
- 72 MIKATA, K.; ISOBE, N.; KANEKO, H. Biotransformation and Enzymatic Reactions of Synthetic Pyrethroids in Mammals. **Pyrethroids: from Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide**, v. 314, p. 113-135, 2012.
- 73 TAKAKU, T. et al. In Vitro Metabolism of trans-Permethrin and Its Major Metabolites, PBalc and PBacid, in Humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 5001-5005, May 11 2011.
- 74 MORGAN, M. K. Children's Exposures to Pyrethroid Insecticides at Home: A Review of Data Collected in Published Exposure Measurement Studies Conducted in the United States. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, n. 8, p. 2964-2985, Aug 2012.
- 75 KANEKO, H. Pyrethroids: Mammalian Metabolism and Toxicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 2786-2791, Apr 13 2011.
- 76 PEREZ-FERNANDEZ, V.; GARCIA, M. A.; MARINA, M. L. Characteristics and enantiomeric analysis of chiral pyrethroids. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 7, p. 968-989, Feb 2010.
- 77 BRUCKNER, J. V. Differences in sensitivity of children and adults to chemical toxicity: The NAS panel report. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 3, p. 280-285, Jun 2000.
- 78 JOHN, E. M.; SHAIKE, J. M. Chlorpyrifos: pollution and remediation. **Environmental Chemistry Letters**, v. 13, n. 3, p. 269-291, Sep 2015.

- 79 SIMON, D.; HELLIWELL, S.; ROBARDS, K. Analytical chemistry of chlorpyrifos and diuron in aquatic ecosystems. **Analytica Chimica Acta**, v. 360, n. 1-3, p. 1-16, Mar 1998.
- 80 Food and Agriculture Organization of the United Nations. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/chlorpyriphos08.pdf. (Acessado 14/10/2016).
- 81 CACERES, T. et al. Toxicity of chlorpyrifos and TCP alone and in combination to *Daphnia carinata*: The influence of microbial degradation in natural water. **Water Research**, v. 41, n. 19, p. 4497-4503, Nov 2007.
- 82 WANG, P. D. et al. Identification of multi-insecticide residues using GC-NPD and the degradation kinetics of chlorpyrifos in sweet corn and soils. **Food Chemistry**, v. 212, p. 420-426, Dec 2016.
- 83 LIU, P. et al. Assessment of chlorpyrifos exposure and absorbed daily doses among infants living in an agricultural area of the Province of Jiangsu, China. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 87, n. 7, p. 753-762, Oct 2014.
- 84 VENTURA, C. et al. Differential mechanisms of action are involved in chlorpyrifos effects in estrogen-dependent or -independent breast cancer cells exposed to low or high concentrations of the pesticide. **Toxicology Letters**, v. 213, n. 2, p. 184-193, Sep 2012.
- 85 VISWANATH, G. et al. Anti-androgenic endocrine disrupting activities of chlorpyrifos and piperophos. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 120, n. 1, p. 22-29, May 2010.
- 86 FORTENBERRY, G. Z. et al. Association between urinary 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol, a metabolite of chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl, and serum T4

and TSH in NHANES 1999-2002. **Science of the Total Environment**, v. 424, p. 351-355, May 2012.

- 87 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística IBGE. <http://www.ibge.gov.br>. (Acessado 14/10/2016).
- 88 Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - CEPEA. <http://www.cepea.esalq.usp.br>. (Acessado 14/10/2016).
- 89 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/exportacao>. (Acessado 14/10/2016).
- 90 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>. (Acessado 14/10/2016).
- 91 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística IBGE, http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf. (Acessado 14/10/2016).
- 92 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística IBGE, http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2015/estimativa_tcu.shtm. (Acessado 14/10/2016).
- 93 Associação Brasileira de Proteína Animal- ABPA <http://abpa-br.com.br/noticia/producao-de-carne-de-frango-totaliza-13146-milhoes-de-toneladas-em-2015-1545>. (Acessado 14/10/2016).
- 94 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA. http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/bovinocultura_leite_14_15.pdf. (Acessado 14/10/2016).

- 95 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE. ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201604caderno.pdf. (Acessado 14/10/2016)
- 96 BOADA, L. D. et al. Consumption of foods of animal origin as determinant of contamination by organochlorine pesticides and polychlorobiphenyls: Results from a population-based study in Spain. **Chemosphere**, v. 114, p. 121-128, Nov 2014.
- 97 FOCANT, J. F. et al. Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and non-ortho PCBs in Belgian foodstuffs - Assessment of dietary intake. **Chemosphere**, v. 48, n. 2, p. 167-179, Jul 2002.
- 98 LIEM, A. K. D.; FURST, P.; RAPPE, C. Exposure of populations to dioxins and related compounds. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 4, p. 241-259, Apr 2000.
- 99 United States Department of Agriculture-USDA-Branded Food Products Database
<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list?fgcd=Branded+Food+Products+Database&ds=Branded+Food+Products>. (Acessado 25/04/2017)
- 100 MAFFEI, D. F.; DE ARAUJO NOGUEIRA, A. R.; GOVONI BRONDI, S. H. Pesticides residue determination in cattle plasma by gas chromatography-mass spectrometry. **Quimica Nova**, v. 32, n. 7, p. 1713-1716, 2009.
- 101 CHATTERJEE, N. S. et al. Multiresidue analysis of multiclass pesticides and polyaromatic hydrocarbons in fatty fish by gas chromatography tandem mass spectrometry and evaluation of matrix effect. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1-8, Apr 2016.
- 102 HELGESEN, K. O. et al. Deltamethrin resistance in the sea louse *Caligus rogercresseyi* (Boxhall and Bravo) in Chile: bioassay results and usage data

for antiparasitic agents with references to Norwegian conditions. **Journal of Fish Diseases**, v. 37, n. 10, p. 877-890, Oct 2014.

¹⁰³ LEDOUX, M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 8, p. 1021-1036, Feb 2011.

¹⁰⁴ HAN, L. J. et al. Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticide residues and environmental contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1449, p. 17-29, Jun 2016.

¹⁰⁵ ANDRADE, A. S. et al. Evaluation of lipid removal from animal fats for the determination of organochlorine, pesticides, and polychlorinated biphenyl indicators by gas chromatography with electron capture detector. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 17, p. 2233-2240, Sep 2012.

¹⁰⁶ GULLICK, D. R.; MOTT, K. B.; BARTLETT, M. G. Chromatographic methods for the bioanalysis of pyrethroid pesticides. **Biomedical Chromatography**, v. 30, n. 5, p. 772-789, May 2016.

¹⁰⁷ BARKER, S. A.; LONG, A. R.; SHORT, C. R. Isolation of drug residues from tissues by solid-phase dispersion. **Journal of Chromatography**, v. 475, p. 353-361, Jul 1989.

¹⁰⁸ BARKER, S. A. Matrix solid phase dispersion (MSPD). **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 2, p. 151-162, Mar 2007.

¹⁰⁹ FRENICH, A. G.; PLAZA-BOLANOS, R.; VIDAL, J. L. M. Comparison of tandem-in-space and tandem-in-time mass spectrometry in gas chromatography determination of pesticides: Application to simple and complex food samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1203, n. 2, p. 229-238, Sep 5 2008.

- 110 ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of Aoac International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, Mar-Apr 2003.
- 111 LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; YUN, S. J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of Aoac International**, v. 88, n. 2, p. 630-638, Mar-Apr 2005.
- 112 BRONDI, S. H. G. et al. Application of QuEChERS method and gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of cypermethrin residue in milk. **Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes**, v. 46, n. 8, p. 671-677, 2011.
- 113 RAWN, D. F. K.; JUDGE, J.; ROSCOE, V. Application of the QuEChERS method for the analysis of pyrethrins and pyrethroids in fish tissues. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 6, p. 2525-2531, Jul 2010.
- 114 MARANGI, M. et al. Acaricide Residues in Laying Hens Naturally Infested by Red Mite *Dermanyssus gallinae*. **Plos One**, v. 7, n. 2, Feb 21 2012.
- 115 MENEGHINI, L. Z. et al. Multivariate Optimization for Extraction of Pyrethroids in Milk and Validation for GC-ECD and CG-MS/MS Analysis. **International journal of environmental research and public health**, v. 11, n. 11, p. 11421-37, 2014.
- 116 DELL'ORO, D. et al. Determination of pyrethroids in chicken egg samples: development and validation of a confirmatory analytical method by gas chromatography/mass spectrometry. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 5, p. 1391-1400, May 2014.

- 117 KHAY, S. et al. Simultaneous determination of pyrethroids from pesticide residues in porcine muscle and pasteurized milk using GC. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 2, p. 244-251, Jan 2009.
- 118 PICO, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 84-99, Feb 2013.
- 119 SORIA, A. C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 7, p. 323-331, Jul 2010.
- 120 HILDMANN, F. et al. Pesticide residues in chicken eggs - A sample preparation methodology for analysis by gas and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1403, p. 1-20, Jul 17 2015.
- 121 GOULART, S. M. et al. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1320-1323, Jun 15 2008.
- 122 CORCELLAS, C.; ELJARRAT, E.; BARCELO, D. Enantiomeric-selective determination of pyrethroids: application to human samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 3, p. 779-786, Jan 2015.
- 123 JIA, F. Y. et al. New strategy to enhance the extraction efficiency of pyrethroid pesticides in fish samples using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method. **Analytical Methods**, v. 4, n. 2, p. 449-453, Feb 2012.
- 124 DEATLEY, A.; ZHAO, L. M.; LUCAS, D. Innovative Sample Prep Removes Lipids Without Losing Analytes. **American Laboratory**, v. 47, n. 9, p. 32-34, Nov-Dec 2015.

- 125 NIEWIADOWSKA, A. et al. Determination of pyrethroid residues in meat by gas chromatography with electron capture detection. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 54, n. 4, p. 595-599, 2010.
- 126 HAN, L. J.; SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Method validation for 243 pesticides and environmental contaminants in meats and poultry by tandem mass spectrometry coupled to low-pressure gas chromatography and ultrahigh-performance liquid chromatography. **Food Control**, v. 66, p. 270-282, Aug 2016.
- 127 CHUNG, S. W. C.; LAM, C. H. Development and validation of a method for determination of residues of 15 pyrethroids and two metabolites of dithiocarbamates in foods by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, n. 3, p. 885-896, May 2012.
- 128 VAN DER HOFF, G. R.; VAN ZONEN, P. Trace analysis of pesticides by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 843, n. 1-2, p. 301-322, May 1999.
- 129 LOVELOCK, J. E. The electron capture detector. **Journal of Chromatography A**, v. 99, p. 3-12, 1974.
- 130 VALVERDE, A. et al. What are we determining using gas chromatographic multiresidue methods: tralomethrin or deltamethrin? **Journal of Chromatography A**, v. 943, n. 1, p. 101-111, Jan 2002.
- 131 SANTOS, F. J.; GALCERAN, M. T. Modern developments in gas chromatography-mass spectrometry-based environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1-2, Jun 6 2003.

- 132 ARNON, S. et al. Transport of testosterone and estrogen from dairy-farm waste lagoons to groundwater. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 15, p. 5521-5526, 2008.
- 133 WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D. **Introduction to mass spectrometry** 2007.
- 134 AGILENT. www.bercaniaga.com/agilent7000.php. (acessado 10/11/2016)
- 135 BRONDI, S. H. G. et al. Development and validation of the quechers method for the determination of veterinary drug residues in buffalo milk and meat. **Quimica Nova**, v. 36, n. 1, p. 153-158, 2013.
- 136 OLIVEIRA, F. A. et al. Pesticides residues in the *Prochilodus costatus* (Valenciennes, 1850) fish caught in the Sao Francisco River, Brazil. **Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes**, v. 50, n. 6, p. 398-405, Jun 3 2015.
- 137 SANCO GUIDE http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf. (acessado 22/02/2014).
- 138 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. **Guia de validação e controle de qualidade analítica. Brasília.** (acessado 22/02/2014).
- 139 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE. http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201504_publicacao_completa.pdf. (acessado 10/11/2016).
- 140 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/pescado>. (acessado 10/11/2016).

- 141 Associação Brasileira de Proteína Animal- ABPA <http://abpa-br.com.br/noticia/producao-de-ovos-do-brasil-cresce-61-e-chega-a-395-bilhoes-de-unidades-1550>. (acessado 06/11/2016).
- 142 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/default.shtm. (acessado 08/11/2016).
- 143 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/defaulttabzip_brasil.shtm. (acessado 10/11/2016).
- 144 HINKLE, D.; WIERSMA, W.; JURIS, S. **Applied Statistics for the Behavioral Sciences**. 5th ed. Boston: Houghton Mifflin; 2003.
- 145 KAN, C. A.; PETZ, M. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 6397-6403, Dec 2000.
- 146 STEFANELLI, P. et al. Multiresidue analysis of organochlorine and pyrethroid pesticides in ground beef meat by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes**, v. 44, n. 4, p. 350-356, 2009.
- 147 LIU, Z. B. et al. A highly efficient extraction, separation and detection method for pyrethroids in pork using the interaction between pyrethroids and protein. **Analytical Methods**, v. 6, n. 5, p. 1353-1358, 2014.
- 148 JIA, F. et al. Extraction and Detection of Pyrethroids Pesticides in Fish Using Acetonitrile-Salt-H₂O System Coupled with Gas Chromatography. **Acta Chimica Sinica**, v. 70, n. 4, p. 485-491, Feb 28 2012.

- 149 ZHAO, D. et al. Determination of Cypermethrin Residues in Crucian Carp Tissues by MSPD/GC-ECD. **Chromatographia**, v. 73, n. 9-10, p. 1021-1025, May 2011.
- 150 HERNANDES, T. et al. Simple Method to Determine Residual Cypermethrin and Deltamethrin in Bovine Milk. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 9, p. 1656-1661, Sep 2014.
- 151 SHAMSIPUR, M.; YAZDANFAR, N.; GHAMBARIAN, M. Combination of solid-phase extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by GC-MS for determination of pesticide residues from water, milk, honey and fruit juice. **Food Chemistry**, v. 204, p. 289-297, Aug 1 2016.
- 152 FERNANDEZ-ALVAREZ, M. et al. Simultaneous Extraction and Cleanup Method Based on Pressurized Solvent Extraction for Multiresidue Analysis of Pesticides in Complex Feed Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 3963-3973, May 2009.
- 153 JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Chemical dietary exposure and the risks to human health. **Quimica Nova**, v. 32, n. 7, p. 1898-1909, 2009.
- 154 World Health Organization. http://www.who.int/ceh/capacity/Children_are_not_little_adults.pdf. (Acessado 25/10/2016).
- 155 World Health Organization. http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/pesticide_en.pdf. (Acessado 25/10/2016).
- 156 Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/family-farming/detail/fr/c/318227/>. (Acessado 23/10/2016).

- 157 BARBINI, D. A. et al. Development of an analytical method for the determination of the residues of four pyrethroids in meat by GC-ECD and confirmation by GC-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 6, p. 1791-1798, Nov 2007.
- 158 UL HASSAN, A. et al. Organochlorine and pyrethroid pesticides analysis in dairy milk samples collected from cotton growing belt of punjab, pakistan. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 51, n. 2, p. 331-335, Jun 2014.
- 159 CHENG, J. et al. Determination of pyrethroids in porcine tissues by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography. **Meat Science**, v. 82, n. 4, p. 407-412, Aug 2009.
- 160 ANAGNOSTOPOULOS, C. et al. Development of an Easy Multiresidue Method for Fat-Soluble Pesticides in Animal Products Using Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 1, p. 205-216, Jan 2014.

Apêndice A. Tabela com os valores de LMRs de diferentes referências internacionais como a EC, EPA-US, Códex, JFCRF e nacional PNCRC/Animal 2017 para a BIF, CIF, λ-CIA, CIP, DEL, PER, FEN e CLO em músculo bovino, de frango, de peixe, ovos e leite.

	Músculo bovino (mg kg ⁻¹)					Músculo frango (mg kg ⁻¹)					Músculo peixe (mg kg ⁻¹)		
	EC	EPA	PNCRC	CÓDEX	JFCRF	EC	EPA	PNCRC	CÓDEX	JFCRF	EPA	PNCRC	JFCRF
BIF	0,20	0,50	3,0	3,0	0,50	0,05	0,05	0,01	NI	0,05	NI	0,01	NI
CIF	0,05	0,10	0,05	0,2	0,02	0,05	0,01	0,05	0,01	0,20	NI	0,01	NI
λ-CIA	0,05	0,20	0,50	3,0	0,02	0,05	0,01	0,02	NI	0,02	NI	0,01	NI
CIP	2,0	0,20	2,0	2,0	0,10	0,10	0,05	0,10	0,10	0,05	NI	0,01	0,01
DEL	0,03	0,02	0,05	0,5	0,03	0,02	0,02	0,01	0,10	0,03	0,01	0,01	0,01
PER	0,05	0,10	0,05	1,0	0,40	0,05	0,05	0,10	0,10	0,10	NI	0,01	NI
FEN	0,025	NI	0,025	1,0	0,90	0,02	NI	0,02	NI	0,01	NI	0,01	NI
CLO	NI	0,05	0,50	1,0	0,50	0,05	0,10	0,05	0,01	0,08	NI	0,01	NI

	Ovos (mg kg ⁻¹)					Leite (mg L ⁻¹)				
	EC	EPA	PNCRC	CÓDEX	JFCRF	EC	EPA	PNCRC	CÓDEX	JFCRF
BIF	0,01	0,05	0,01	NI	0,01	0,20	0,10	0,20	0,20	0,20
CIF	0,02	0,01	0,01	0,01	0,05	0,02	0,20	0,01	0,01	0,04
λ-CIA	0,05	0,01	0,02	NI	0,02	0,05	0,40	0,20	0,20	0,03
CIP	0,05	0,05	0,01	0,01	0,05	0,05	0,10	0,05	0,05	0,05
DEL	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,05	0,02	0,05	0,05	0,03
PER	0,05	0,10	0,01	0,10	0,10	0,05	0,88	0,05	NI	0,10
FEN	0,02	NI	0,02	NI	0,01	0,04	NI	0,10	0,10	0,10
CLO	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02

EC-Comissão Europeia-LMRs ajustados pelas regulamentações (EC-2017/170; EC-2016/1902; EC-2017/626; EC-2017/626; EC-2016/1822; EC-2017/623; EC-2015/399; EC-2016/60).

EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos- LMRs ajustados pelas regulamentações (EPA-62 FR 31002/1997; EPA-80 FR 72599/2015; EPA-80 FR 72599/2015; EPA-82 FR 18580/2017; EPA-72 FR 52019/2007; EPA-76 FR 56656/2011).

PNCRC- Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – LMRs ajustados pelo PNCRC/Animal com Instrução Normativa n-09, de 21 de fevereiro de 2017.

CÓDEX – Códex Alimentarius- – LMRs ajustados pelas normas de 2003, 2004, 2009, 2011 e 2013).

JFCRF – Fundação de pesquisa japonesa de resíduos químicos em alimentos.

NI - Não informado.

Apêndice B. Revisão da literatura científica ressaltando a metodologia de análise dos piretróides, tipos de alimentos de origem animal, recuperação e limites de detecção e quantificação, estes dados foram extraídos de artigos pesquisados na base de dados *web of knowledge*¹⁵.

Apenas dos piretróides

Matriz	Inseticidas	Quantidade de amostra	Extração e <i>clean up</i>	Análise instrumental	Recuperação % (fortificação)	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	PI	Número de amostras	Ref.
Músculo bovino	BIF, λ -CIA, PER, CIP	25 g	Soxhlet-Cartuchos C18, extrelut(NT3) e florisil	GC-ECD e GC-EI-MS	NI	4 a 20	50 - 250	PCB 189		157
Músculo bovino	OC, BIF, λ -CIA, PER, CIP, FEN, DEL	10 g	ASE-Cartuchos C18 e florisil	GC-EI-MS	84 - 99 (0,5 LMR)	NI	13 - 125	PCB 209	50	146
Músculo bovino, porco e aves	BIF, CIP, CIP, DEL, CIA	10 g	Sólido-líquido- Congelamento e florisil	GC-ECD	64 - 97 (10,20,50 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	5	10	NU	687	125
Músculo bovino, porco e frango	BIF, CIP, CIA, PER, CIP, DEL, FENP, CLO, multir esiduo	5 g	QuEChERS α SPE(C18,PSA,zirc ônio)	GC-EI-MS/MS	65 - 118 (10,25,100 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	NI	NI	d5-atrazina	9	126

NI – Não informado; NU – Não utilizado; FENP-fenpropratrina; BIO-Bioaletrina; α SPE-fase adsorvente dispersa.

Matriz	Inseticidas	Quantidade de amostra	Extração e <i>clean up</i>	Análise instrumental	Recuperação % (fortificação)	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	PI	Número de amostras	Ref.
Frango (diferentes órgãos)	Carbaril, PER	10 g	QuEChERS-MSPD	LC-(ESI+)MS/MS	76 - 93	5	NI	NU	45 amostras	114
Leite	CIP	10 g	QuEChERS-MSPD	GC-EI-MS	92 - 105 (50,100,200 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	10	40	NU		112
Leite	DEL,CIP	4 mL	Líquido-líquido-Congelamento	GC-ECD	84 - 93	0,25	0,75	NU		121
Leite	BIF,CIP, DEL,PER, OC		Líquido-líquido-Cartuchos extrelut NT3	HPLC-UV	79 - 104	30 - 50	50 - 100	NU	150 amostras	158
Leite	γ -CIA, λ -CIA,CIP, CIF,DEL,F EN,PER	5 mL	Líquido-líquido-Congelamento	GC-ECD e GC-EI-MS/MS	87 - 101(0,5;1;1,5 LMR)	0,3 - 1	0,9 - 3	NU	50 amostras	115
Leite e músculo de porco	CIA,CIP, CIF,DEL	10 g	Líquido-líquido-Congelamento, cartucho de florisil	GC-ECD e GC-EI-MS	83 - 109 (leite0,5;2;4 LMR)	3000 - 8000	9000 - 24000	NU	12 amostras	117

NI – Não informado; NU – Não utilizado; FENP-fenpropratrina; BIO-Bioaletrina; dSPE-fase adsorvente dispersa.

Matriz	Inseticidas	Quantidade de amostra	Extração e <i>clean up</i>	Análise instrumental	Recuperação % (fortificação)	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	PI	Número de amostras	Ref.
Ovos de galinha	CIP,CIF,DEL,FEN,PER,FENV	5 g (gema)	Líquido-líquido, Cartuchos C18 e extrelut(NT3)	GC-EI-MS/MS	80 - 108 (0;0,5;1;1,5 LMR)	1 a 7		PCB 209		116
Ovos de galinha e vegetais	CIP,CIF,DEL (outras classes)	0,5 g	MSPD - Coluna C18 florisil	GC-EI-MS/MS	NI	NI	NI	Cafeina		109
Ovos de galinha	ACRIN,BIF,CIF,CIA,CIP,DEL,ESF,ETO,FE NP,FENV,FLUM,FLUV,PER,FENO,RES,TEF,(MULTI RESÍDUO)	5 g	MSPD - GPC em pequena escala – cartuchos C18/PSA	GC(PTV)-EI-MS/MS	73 - 116 (5,10,50 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	NI	5	Tribromobenzeno		120
Ovos de galinha	BIF,CIP,DEL,PER (+ outros)	0,25 g (liofilizado)	MSPD - Cartucho de C18/florisil	GC-EI-MS	53 - 75 (1,25 $\mu\text{g g}^{-1}$)	3 a 15	10 a 50	NU		27
Peixe (diferentes órgãos)	CLO,FLU(multiresíduo)	10 g	QuEChERS	LC-(ESI+/-)MS/MS	NI	5	10	NU	36 amostras	136
Peixe	CIH,CIP,DEL,FENV,FEN,TET	2 g	QuEChERS	GC-ECD	81 - 108 (0,2;0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	9	14	NU		123

NI – Não informado; NU – Não utilizado; FENP-fenpropratrina; BIO-Bioaletrina; dSPE-fase adsorvente dispersa.

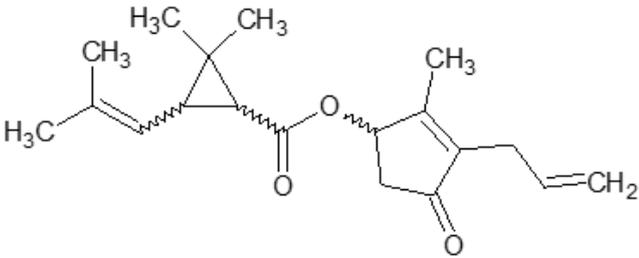
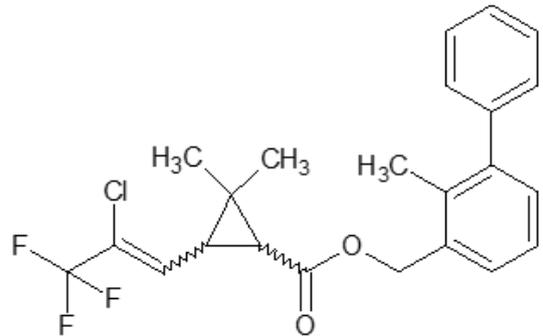
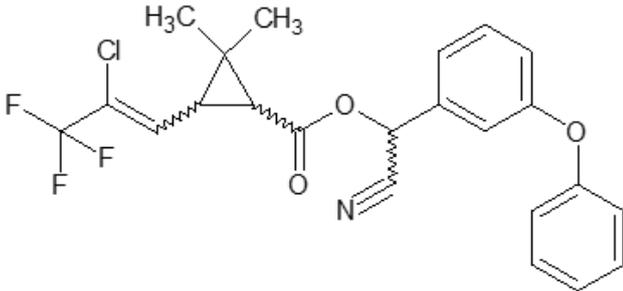
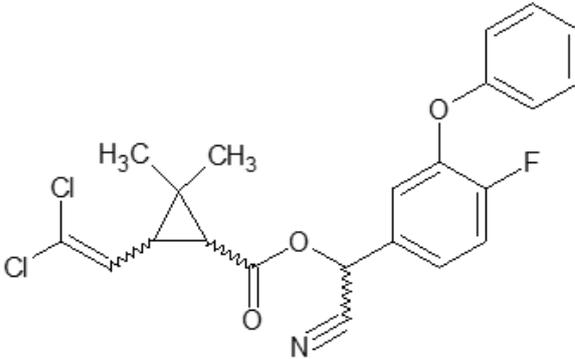
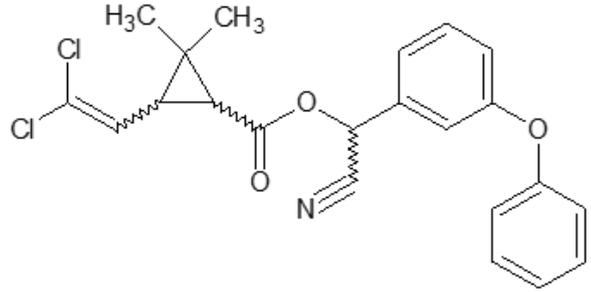
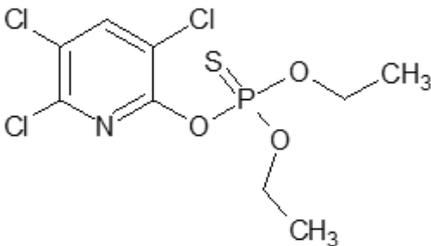
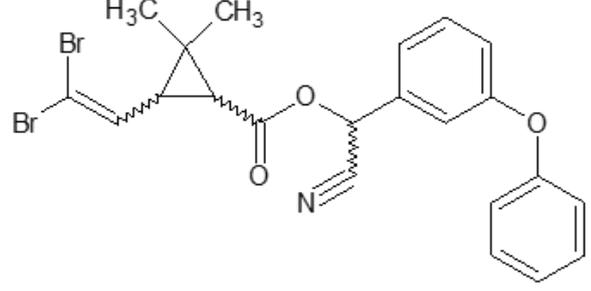
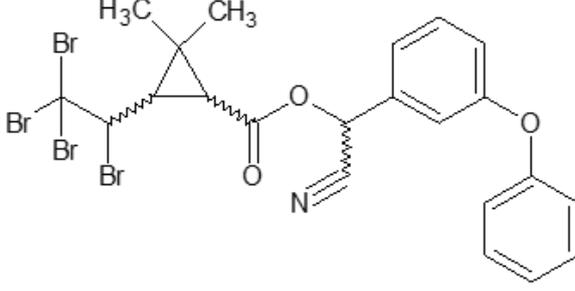
Matriz	Inseticidas	Quantidade de amostra	Extração e <i>clean up</i>	Análise instrumental	Recuperação % (fortificação)	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	PI	Número de amostras	Ref.
Peixe, porco, abacate e couve	BIF, CIF, CIP, DEL, FENP, PER, RESM, CLO, multiresíduo	10 g	QuEChERS EMR-Lipídio	GC-EI-MS/MS	33 – 101 (10;25;100 ng g ⁻¹)			d5-atrazina		104
Peixe	CIP, DEL, (+ as 6 naturais)	5 g	QuEChERS	GC-NCI-MS (Gás metano)	70 - 107 (4;20;40 ng g ⁻¹)	0,3 - 0,5	NI	13C cis e trans permetrina		113
Peixe (diferentes tecidos)	CIP	0,5 g	MSPD	GC-ECD	85 - 106 (50 - 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	1,4	5,8	NU	30 amostras	149
Porco (diferentes órgãos)	CIP, DEL	0,5 g	MSPD	HPLC-UV	83 - 109 (0,2;0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$)	10	26	NU		159
Porco	CIA, CIP, DEL, FENP, FENV, TET	2 g	Sólido-líquido/PSA	GC-ECD	79 - 90 (25-250 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	8 a 14	NI	NU		147
Leite	CIP, DEL	5 g	MSPD	GC-ECD e GC-EI-MS	60 - 81 (10-100 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	2 a 7	10	NU	20 amostras	150

NI – Não informado; NU – Não utilizado; FENP-fenpropratrina; BIO-Bioaletrina; dSPE-fase adsorvente dispersa.

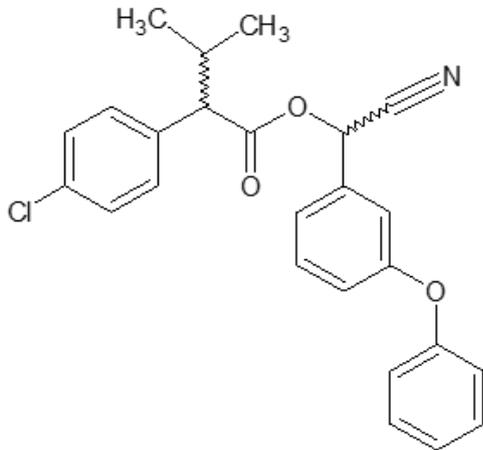
Matriz	Inseticidas	Quantidade de amostra	Extração e <i>clean up</i>	Análise instrumental	Recuperação % (fortificação)	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	PI	Número de amostras	Ref.
Peixe	BIF,CIF, CIA,CIP, DEL,FENV,PER,TET	0,3 g (liofilizado)	Sólido-líquido/ultrasom- Cartuchos de C18 e alumina básica	GC-NCI-MS/MS (Gás amônia)	53 - NI	0,03-0,46 ng g lw	0,10-1,54 ng g lw	d6-transcipermetrina e d6-transpermetrina		12
Leite, músculo bovino	ETOF(multiresíduo)	5 g	QuEChERS	LC-(ESI+)MS/MS	NI	3	10	NU		160
Peixe	DEL, BIO, FENV, CIP, BIF,FENP	5 g	Sólido-líquido- Cartuchos de florisl C18 e PSA	GC-EI-MS/MS	60 – 127 (10, 25 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	1 - 4	2 -13	NU		101
Músculo de (bovino, peixe, pato e porco), leite e ovos	BIF,CIF,CIA, CIP,ETOF, DEL,FENP, FENV,FLUM,FLUV	15 g	QuEChERS	LC-(ESI+)MS/MS	70 – 120 (10 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	3	10	¹³ C ₆ -cipermetrina, d4-etilenotiouréia	600	127

NI – Não informado; NU – Não utilizado; FENP-fenpropratrina; BIO-Bioaletrina; dSPE-fase adsorvente dispersa.

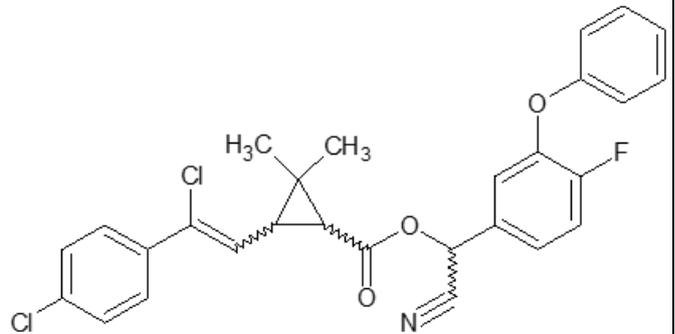
Apêndice C. Fórmulas moleculares e estruturais dos inseticidas utilizados neste trabalho e suas massas moleculares (MM - g mol⁻¹).

<p>Aletrina C₁₉H₂₆O₃ MM 302,4079</p>	<p>Bifentrina C₂₃H₂₂ClF₃O₂ MM 422,8678</p>
	
<p>Cialotrina C₂₃H₁₉ClF₃NO₃ MM 449,8501</p>	<p>Ciflutrina C₂₂H₁₈Cl₂FNO₃ MM 434,2876</p>
	
<p>Cipermetrina C₂₂H₁₉Cl₂NO₃ MM 416,2972</p>	<p>Clorpirifós C₉H₁₁Cl₃NO₃PS MM 350,5863</p>
	
<p>Deltametrina C₂₂H₁₉Br₂NO₃ MM 505,1991</p>	<p>Tralometrina C₂₂H₁₉Br₄NO₃ MM 665,0072</p>
	

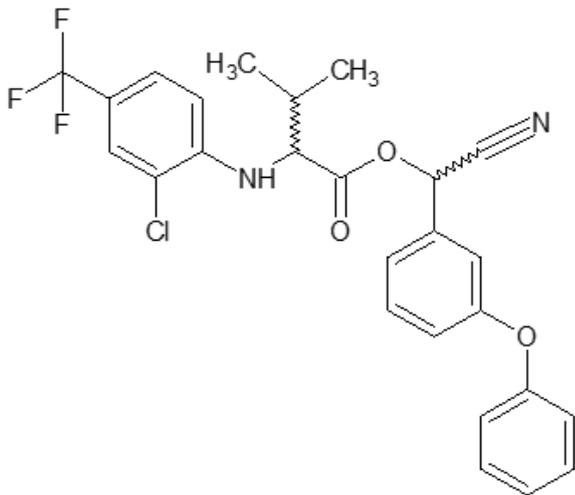
Fenvalerato $C_{25}H_{22}ClNO_3$ MM 419,9001



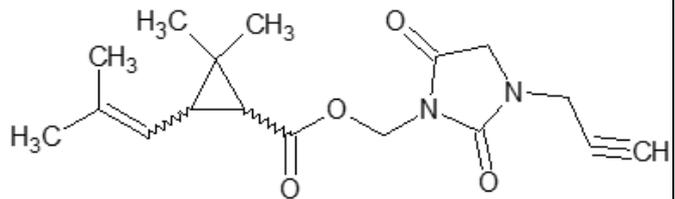
Flumetrina $C_{28}H_{22}Cl_2FNO_3$ MM 510,3836



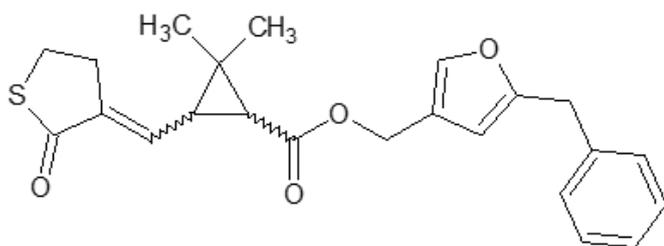
Fluvalinato $C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$ MM 502,9127



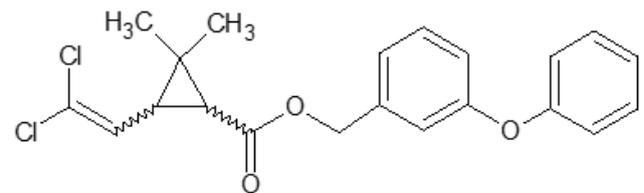
Imiprotrina $C_{17}H_{22}N_2O_4$ MM 318,3676

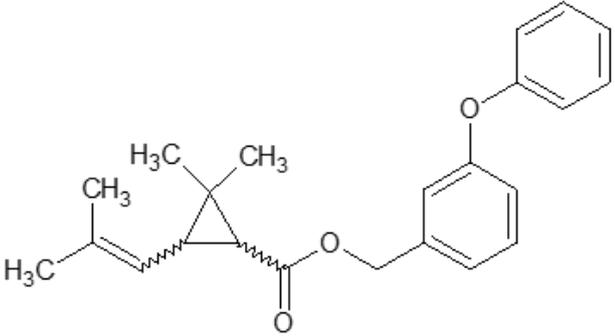
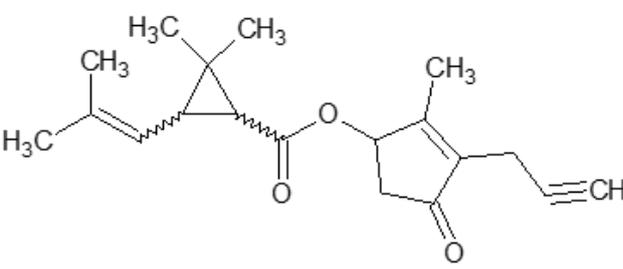
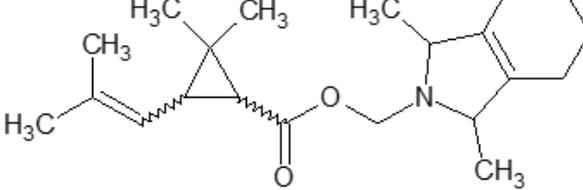
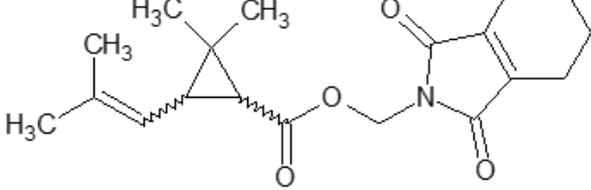
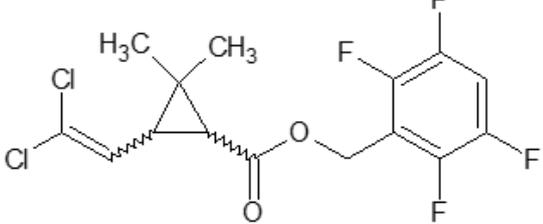


Kadetrina $C_{23}H_{24}O_4S$ MM 396,4993



Permetrina $C_{21}H_{20}Cl_2O_3$ MM 391,2877



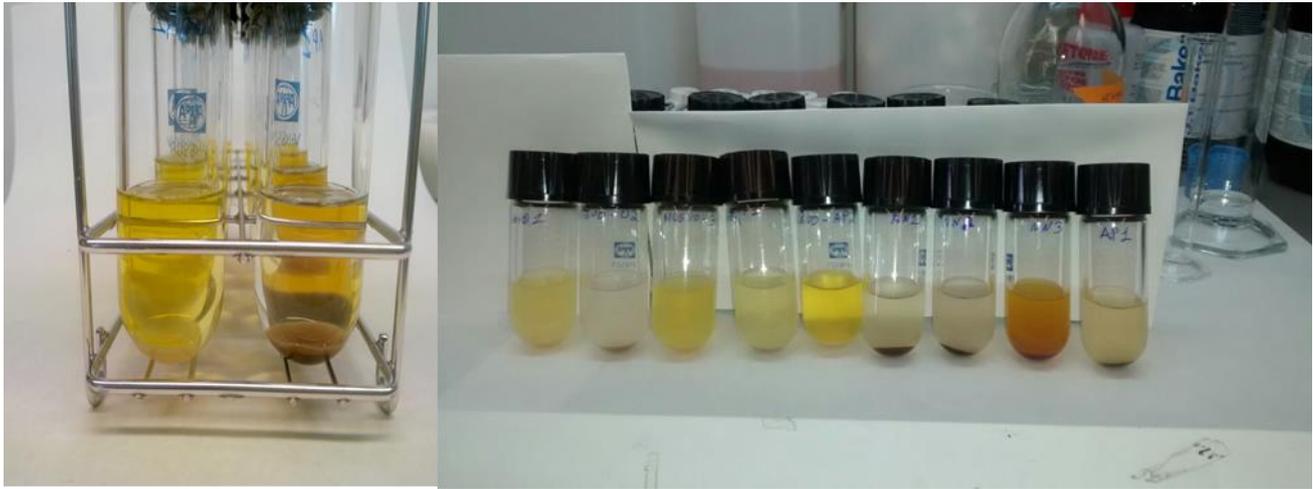
<p>Fenotrina $C_{23}H_{26}O_3$ MM 350,4507</p>	<p>Praletrina $C_{19}H_{24}O_3$ MM 300,3921</p>
	
<p>Resmetrina $C_{21}H_{33}NO_2$ MM 331,4922</p>	<p>Tetrametrina $C_{19}H_{25}NO_4$ MM 331,4061</p>
	
<p>Transflutrina $C_{15}H_{12}Cl_2F_4O_2$ MM 371,1542</p>	
	

Apêndice D. Tempo de retenção, faixa linear, coeficiente de determinação, transições monitoradas, energias de colisão e valores de *Dwell* para os 17 piretróides e clorpirifós avaliados

Compostos	T_r^a (min)+/-DP	R^{2b}	Faixa linear (ng mL ⁻¹)	Transição de quantificação (m/z)	CE ^c (eV)	Transição de qualificação (m/z)	CE (eV)	“Dwell time” (ms)
Transflutrina	4,62+/-0,01	0,999	0,01-75	207-35	10	209-35	10	15
Clorpirifós ^d	4,88+/-0,01	0,999	0,01-75	313-189	25	313-95	10	15
Aletrina	5,43+/-0,01	0,999	0,1-75	301-167	15	301-133	20	10
Praletrina	5,58+/-0,01	0,999	0,5-75	299-167	20	299-131	20	10
Imiprotrina	6,38+/-0,01-6,45+/-0,01	0,999	0,5-75	317-167	15	317-149	5	10
Resmetrina	6,78+/-0,01-6,85+/-0,01	0,998	0,5-75	337-149	10	337-187	15	10
Tetrametrina	6,98+/-0,01-7,07+/-0,01	0,999	0,01-75	331-167	2			10
Bifentrina	7,06+/-0,01	0,999	0,01-75	205-141	20	205-121	10	10
Fenotrina	7,25+/-0,01-7,31+/-0,01	0,997	0,1-75	349-149	10	349-169	10	10
Cialotrina	7,46+/-0,01-7,55+/-0,01	0,999	0,01-75	205-121	10	205-141	20	10
Permetrina	7,88+/-0,01-7,96+/-0,01	0,998	0,01-75	207-35	10	209-35	10	10
Ciflutrina	8,22+/-0,01-8,30+/-0,01-8,36+/-0,01	0,999	0,01-75	207-35	10	209-35	10	10
Cipermetrina	8,40+/-0,01-8,48+/-0,01-8,54+/-0,01	0,999	0,01-75	207-35	10	209-35	10	10
Fenvalerato	8,92+/-0,01-9,08+/-0,01	0,999	0,01-75	211-167	2	213-169	2	10
Fluvalinato	9,08+/-0,01-9,14+/-0,01	0,999	0,05-75	294-250	15	294-194	2	10
Deltametrina	9,45+/-0,01	0,999	0,01-75	217-81	2	297-79	2	10
Kadetrina	10,46+/-0,07	0,999	0,5-75	395-229	10	395-165	15	10
Flumetrina	12,15+/-0,01-12,27+/-0,01	0,999	0,01-75	283-35	15	247-35	25	10
d ₁₀ -Clorpirifós	4,85+/-0,01	-----	-----	323-95	25	323-189	10	15
d ₆ - <i>trans</i> -permetrina	7,95+/-0,01	-----	-----	213-35	10	215-35	10	10
d ₆ - <i>trans</i> -cipermetrina	8,46+/-0,01-8,52+/-0,01	-----	-----	213-35	10	215-35	10	10

a – tempo de retenção para cada isômero b – coeficiente de determinação c – energia de colisão d – organofosforado

Apêndice E. Amostras após a extração assistida por ultrassom e centrifugação.



Apêndice F. Tandem de cartuchos de alumina básica e C18 utilizados na etapa de *clean up*.



Apêndice G. Recuperação e desvio padrão relativo para os níveis de fortificação de 1 e 5 ng.

Compostos	Fortificação (1 e 5 ng): Recuperação(%) - DPR (%)				
	Frango	Bovino	Peixe	Ovos	Leite
Transflutrina	1: 47,9-8,8 5: 66,8-0,5	1: 64,0-1,8 5: 68,8-2,3	1: 41,1-16,0 5: 78,5-5,8	1: 56,4-6,6 5: 76,5-1,3	1: 62,6-4,4 5: 67,0-6,0
Clorpirifós ^a	1: 48,7-8,1 5: 73,6-2,0	1: 74,0-1,5 5: 71,8-1,1	1: 26,6-14,9 5: 76,9-2,9	1: 58,5-3,1 5: 81,3-3,0	1: 72,3-0,1 5: 72,5-6,4
Aletrina	1: 53,8-6,3 5: 81,4-1,7	1: 82,0-15,4 5: 78,9-0,4	1: 88,3-13,3 5: 77,0-4,1	1: 55,3-7,7 5: 83,1-1,4	1: 63,7-16,5 5: 73,1-7,5
Praletrina	1: 87,8-2,8 5: 79,1-4,9	1: 69,4-8,2 5: 64,8-4,7	1: 54,0-6,4 5: 86,3-4,7	1: 84,3-1,3 5: 87,1-4,4	1: 89,1-4,3 5: 76,5-3,3
Imiprotrina	1: 86,5-3,6 5: 86,8-2,0	1: 98,2-6,7 5: 91,1-1,7	1: 72,9-13,5 5: 92,7-3,2	1: 76,8-11,3 5: 95,5-3,3	1: 87,9-6,7 5: 82,1-9,2
Resmetrina	1: 100,8-4,7 5: 117,4-0,8	1: 94,7-4,6 5: 83,5-4,0	1: 84,0-12,2 5: 86,3-6,7	1: 88,5-1,2 5: 85,7-5,8	1: 112,8-5,4 5: 124,7-1,3
Tetrametrina	1: 82,6-1,6 5: 104,5-1,9	1: 106,6-6,6 5: 109,3-0,1	1: 69,1-15,1 5: 105,9-2,8	1: 67,0-5,5 5: 108,1-3,1	1: 87,5-0,7 5: 106,6-2,1
Bifentrina	1: 92,4-7,1 5: 76,6-0,6	1: 90,2-4,4 5: 86,3-3,0	1: 88,9-7,6 5: 89,0-4,2	1: 82,7-4,9 5: 86,4-2,4	1: 86,3-0,8 5: 79,1-3,6
Fenotrina	1: 88,2-7,7 5: 56,4-6,0	1: 90,2-6,3 5: 89,8-9,4	1: 80,6-8,3 5: 79,8-4,2	1: 81,3-2,2 5: 82,1-4,5	1: 85,5-7,2 5: 64,7-11,5
Cialotrina	1: 67,6-5,6 5: 91,3-1,2	1: 79,4-17,0 5: 93,9-19,2	1: 67,6-3,8 5: 97,9-2,2	1: 69,8-4,1 5: 96,7-2,4	1: 70,6-4,9 5: 100,4-0,4
Permetrina	1: 86,9-7,2 5: 81,3-0,8	1: 87,6-3,4 5: 86,4-2,7	1: 83,9-3,8 5: 54,6-4,1	1: 96,7-5,7 5: 88,4-1,7	1: 70,7-4,0 5: 89,1-3,1
Ciflutrina	1: 84,1-6,5 5: 85,4-1,1	1: 103,9-4,2 5: 93,7-5,4	1: 81,9-5,6 5: 83,9-2,3	1: 84,6-5,6 5: 91,8-2,5	1: 77,0-8,0 5: 85,1-3,4
Cipermetrina	1: 94,9-4,0 5: 86,2-1,9	1: 98,2-6,3 5: 89,4-1,7	1: 96,6-5,1 5: 90,4-1,3	1: 91,3-6,8 5: 92,8-0,6	1: 90,7-2,3 5: 79,8-2,5
Fenvalerato	1: 93,4-2,4 5: 87,2-0,2	1: 97,3-7,0 5: 84,4-3,4	1: 87,0-3,7 5: 92,6-1,6	1: 88,6-6,6 5: 90,8-1,3	1: 87,3-2,9 5: 97,1-3,1
Fluvalinato	1: 89,5-2,6 5: 88,6-0,1	1: 98,4-7,7 5: 86,4-3,0	1: 82,0-4,3 5: 79,9-9,3	1: 84,6-10,7 5: 93,5-0,9	1: 92,4-0,3 5: 99,8-4,2
Deltametrina	1: 75,8-8,7 5: 91,8-0,3	1: 97,8-8,7 5: 92,1-2,2	1: 59,2-19,5 5: 86,8-6,3	1: 63,1-18,9 5: 93,5-2,1	1: 87,1-2,8 5: 96,4-4,5
Kadetrina	1: 107,9-8,5 5: 111,1-2,7	1: 85,2-3,1 5: 82,8-0,4	1: 77,9-2,9 5: 71,7-5,6	1: 85,7-8,1 5: 108,0-8,2	1: 109,5-4,1 5: 114,9-3,7
Flumetrina	1: 81,4-12,2 5: 111,3-1,4	1: 98,4-1,7 5: 87,2-5,6	1: 76,6-10,9 5: 105,6-8,8	1: 82,1-7,3 5: 113,0-7,1	1: 96,8-3,9 5: 127,5-0,9

a - organofosforado

Apêndice H. Fator isomérico calculado a partir dos testes de recuperação.

	FI				
	Frango	Peixe	Ovos	Leite	Bovino
Imiprotrina Cis/Trans	0,94	0,96	1,02	1,06	1,02
Resmetrina Cis/Trans	0,99	0,89	0,86	0,98	1,00
Tetrametrina Cis/Trans	1,09	1,1	1,14	1,22	1,18
Fenotrina Cis/Trans	0,95	1,03	0,99	1,11	1,03
Cihalotrina Cis1/Cis2	1,02	1,03	1,04	0,98	1,00
Permetrina Cis/Trans	1,09	0,91	1,15	1,04	0,91
Ciflutrina Cis1+ Cis2/Trans1+Trans2	1,03	1,07	1,03	1,04	0,99
Cipermetrina Cis1+ Cis2/Trans1+Trans2	1,05	1,07	0,95	1,03	1,02
Fenvalerato Cis/Trans	1,06	1,04	1,05	1,05	1,03
Fluvalinato Cis/Trans	0,97	0,99	0,99	1,03	0,99
Flumetrina Cis/Trans	1,12	1,15	1,13	1,05	1,07

FI – Fator isomérico

Apêndice I. Precisão intermediária (%) para a fortificação de 1 ng nas diferentes matrizes

	Frango	Bovino	Peixe	Ovos	Leite
Transflutrina	18,3	4,1	17,3	16,1	16,2
Clorpirifós	10,0	6,8	16,4	6,1	10,7
Aletrina	13,6	17,1	12,3	8,9	16,0
Praletrina	7,4	13,6	12,4	6,3	7,5
Imiprotina	4,4	6,0	12,4	11,2	13,9
Resmetrina	5,0	11,2	17,9	3,5	6,5
Tetrametrina	14,5	7,3	17,2	16,2	10,0
Bifentrina	11,9	8,5	9,7	11,7	4,6
Fenotrina	8,3	11,7	19,4	9,8	9,0
Cialotrina	12,3	20,4	8,3	6,1	7,6
Permetrina	8,3	6,5	8,6	6,6	9,0
Ciflutrina	8,9	5,3	7,8	5,1	9,1
Cipermetrina	7,0	7,9	8,8	7,1	5,2
Fenvalerato	10,5	8,8	5,4	8,8	5,3
Fluvalinato	8,9	8,5	6,2	12,5	4,8
Deltametrina	9,3	10,6	18,4	19,3	7,6
Kadetrina	15,6	9,4	14,4	13,6	7,0
Flumetrina	15,3	6,7	11,0	16,1	13,7

Apêndice J. LD e LQ (ng kg⁻¹) dos piretróides e clorpirifós utilizando método via GC/NCI-MS/MS em matrizes de origem animal. Os LDs e LQs para a matriz leite estão em ng L⁻¹.

Inseticida	LD					LQ				
	Frango	Bovino	Peixe	Ovos	Leite	Frango	Bovino	Peixe	Ovos	Leite
Transflutrina	0,06	0,06	0,06	0,24	0,11	0,19	0,21	0,19	0,89	0,32
Clorpirifós	0,15	0,07	0,15	0,40	0,38	0,51	0,24	0,49	1,38	1,18
Aletrina	5,68	4,11	5,00	17,25	8,20	18,94	13,73	16,67	57,49	27,46
Praetrina	25,80	20,37	30,26	101,13	30,78	86,01	67,91	100,87	337,25	102,53
Imiprotrina I	8,51	7,08	7,74	31,74	14,26	28,38	23,59	25,80	105,75	47,57
Imiprotrina II	1,65	1,36	1,42	6,48	3,11	5,48	4,51	4,73	21,62	10,46
Resmetrina I	0,97	0,88	11,42	11,34	23,43	3,23	2,93	38,07	37,89	78,19
Resmetrina II	0,34	0,32	3,44	3,81	7,40	1,14	1,07	11,46	12,71	24,72
Tetrametrina I	1,21	1,01	1,57	4,21	2,68	4,06	3,37	5,24	14,01	9,01
Tetrametrina II	0,15	0,14	0,23	0,57	0,43	0,54	0,49	0,75	2,02	1,39
cis-Bifentrina	0,15	1,58	0,17	0,57	1,82	0,54	5,26	0,57	1,94	6,06
Fenotrina I	24,58	8,18	1,85	19,03	11,85	81,91	27,26	6,18	63,40	39,47
Fenotrina II	5,49	2,55	0,57	4,70	4,24	18,30	8,47	1,92	15,71	14,21
Cialotrina I	0,27	1,28	0,21	0,73	0,59	0,91	4,29	0,70	2,43	1,98
Cialotrina II	0,28	0,32	0,24	0,81	0,64	0,96	1,06	0,78	2,67	2,20
Permetrina I	0,98	1,79	0,73	3,81	9,60	3,30	5,99	2,43	12,79	31,91
Permetrina II	3,28	4,77	2,16	13,77	30,03	10,95	15,90	7,21	45,91	100,06
Ciflutrina I	0,68	1,07	0,96	1,70	3,43	2,27	3,56	3,19	5,67	11,37
Ciflutrina II + III	0,51	0,65	0,71	1,21	1,88	1,69	2,16	2,36	4,13	6,22
Ciflutrina IV	1,41	1,58	1,89	3,32	4,56	4,67	5,26	6,29	11,09	15,23
Cipermetrina I	0,92	1,38	1,20	2,51	4,18	3,05	4,61	4,00	8,50	13,89

Inseticida	LD					LQ				
	Frango	Bovino	Peixe	Ovos	Leite	Frango	Bovino	Peixe	Ovos	Leite
Cipermetrina II + III	0,63	0,80	0,82	1,62	2,09	2,09	2,68	2,73	5,51	6,97
Cipermetrina IV	0,83	1,03	1,12	2,11	3,91	2,77	3,42	3,72	7,13	12,98
Fenvalerato I	0,17	0,21	0,15	0,57	0,64	0,55	0,72	0,48	1,78	2,20
Fenvalerato II	0,34	0,46	0,30	1,13	1,72	1,15	1,53	0,98	3,81	5,68
Fluvalinato I	1,48	1,78	1,01	3,48	6,22	4,94	5,92	3,37	11,58	20,75
Fluvalinato II	1,42	1,64	1,02	3,40	6,33	4,74	5,47	3,39	11,26	21,13
Deltametrina	1,38	1,56	2,23	2,75	2,57	4,60	5,17	7,43	9,23	8,58
Kadetrina	0,45	0,44	0,56	3,81	0,86	1,48	1,46	1,87	12,71	2,90
Flumetrina I	1,29	1,37	1,09	4,94	0,91	4,28	4,57	3,64	16,44	3,06
Flumetrina II	1,53	1,67	1,28	5,75	1,45	5,12	5,56	4,28	19,27	4,88

Apêndice K. Níveis máximos, mínimos, médias, taxa de detecção e comparativos com os LMRs para os inseticidas detectados em cada uma das amostras das diferentes matrizes.

	TL ^a (%)	CLO	BIF	CIA	PER	CIP	DEL
Músculo bovino (n=18) µg kg⁻¹							
Média	6,67	3,08	0,53	0,02	0,03	0,88	0,12
Mínima	1,23	nd	nd	nd	nd	0,01	nd
Máxima	21,7	17,5	1,04	0,08	0,04	14,7	0,12
DP	5,64	7,09	0,73	0,03	0,01	3,45	-
LMR ^b		500	3000	500 ^c	50	2000 ^d	30 ^c
Positivas (%)		33	22	61	11	100	6
Frango (n=53) µg kg⁻¹							
Média	6,88	0,03	0,02	0,01	0,02	0,03	0,03
Mínima	1,88	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Máxima	25,6	0,08	0,25	0,03	0,02	0,16	0,04
DP	4,08	0,02	0,04	0,01	-	0,03	0,02
LMR ^b		50	10	20 ^c	100	100 ^d	10
Positivas (%)		15	85	30	2	98	4
Peixe (n=11) µg kg⁻¹							
Média	9,35	nd	0,32	0,01	nd	0,12	nd
Mínima	1,52	nd	nd	nd	nd	0,01	nd
Máxima	21,8	nd	0,66	0,04	nd	0,19	nd
DP	7,03	-	0,26	0,02	-	0,07	-
LMR ^b		10	10	10 ^c	10	10 ^d	10
Positivas (%)		-	73	45	-	100	-

a – Teor de lipídio na amostra liofilizada; b – PNCRC/animal-2017; c – Apenas a lambda; d – soma dos isômeros

	TL ^a (%)	CLO	BIF	CIA	PER	CIP	DEL
Leite (n=38) µg L ⁻¹							
Média	24,8	2.10	0,04	0,04	nd	0,35	0,06
Mínima	2,87	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Máxima	40,7	45,67	0,11	0,28	nd	2,75	0,20
DP	7,85	8,46	0,03	0,07	-	0,62	0,08
LMR ^b		20	200	200 ^c	50	50 ^d	50
Positivas (%)		76	71	79	-	92	13
Ovos (n=27) µg kg ⁻¹							
Média	35,3	0,28	0,01	0,02	nd	0,45	nd
Mínima	30,7	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Máxima	44,5	0,28	0,06	0,04	nd	1,37	nd
DP	3,45	-	0,01	0,02	-	0,44	-
LMR ^b		10	10	20 ^c	10	10 ^d	20
Positivas (%)		4	78	11	-	48	-

a – Teor de lipídio na amostra liofilizada; b – PNCRC/animal-2017; c – Apenas a lambda; d – soma dos isômeros

Apêndice L. Concentração dos inseticidas nas 147 amostras analisadas.

Músculo Bovino $\mu\text{g kg}^{-1}(\text{pu})$	CLO	BIF	CIA	PER	CIP	DEL
1	nd	nd	0,05	0,04	0,09	nd
2	nd	nd	0,01	nd	0,02	nd
3	nd	1,04	<LOQ	nd	0,29	nd
4	0,07	nd	<LOQ	nd	0,02	nd
5	0,47	nd	0,01	0,02	0,02	nd
6	nd	nd	nd	nd	0,01	nd
7	0,01	nd	<LOQ	nd	0,05	nd
8	0,03	nd	nd	nd	0,02	0,12
9	nd	nd	nd	nd	0,02	nd
10	nd	<LOQ	0,08	nd	0,02	nd
11	nd	nd	nd	nd	<LOQ	nd
12	nd	nd	<LOQ	nd	0,22	nd
13	nd	nd	nd	nd	0,01	nd
14	nd	nd	nd	nd	0,01	nd
15	0,38	nd	nd	nd	0,30	nd
16	nd	nd	<LOQ	nd	<LOQ	nd
17	17,54	<LOQ	0,01	nd	14,69	nd
18	nd	nd	<LOQ	nd	0,01	nd
Ovos $\mu\text{g kg}^{-1}(\text{pu})$	CLO	BIF	CIA	PER	CIP	DEL
1	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd
2	nd	0,01	nd	nd	nd	nd
3	nd	0,01	nd	nd	nd	nd
4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5	nd	nd	nd	nd	<LOQ	nd
6	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8	nd	0,01	nd	nd	nd	nd
9	nd	0,02	nd	nd	<LOQ	nd
10	nd	<LOQ	nd	nd	0,51	nd
11	nd	0,02	nd	nd	nd	nd
12	nd	0,02	nd	nd	0,36	nd
13	0,28	0,01	nd	nd	nd	nd
14	nd	0,04	nd	nd	nd	nd
15	nd	0,01	<LOQ	nd	0,59	nd
16	nd	nd	0,03	nd	0,01	nd
17	nd	0,01	nd	nd	0,55	nd
18	nd	0,06	0,04	nd	<LOQ	nd
19	nd	0,01	nd	nd	0,01	nd
20	nd	0,01	nd	nd	nd	nd
21	nd	0,01	nd	nd	0,01	nd
22	nd	0,01	nd	nd	0,94	nd
23	nd	0,02	nd	nd	0,01	nd

Ovos $\mu\text{g kg}^{-1}(\text{pu})$	CLO	BIF	CIA	PER	CIP	DEL
24	nd	0,01	nd	nd	0,65	nd
25	nd	nd	nd	nd	nd	nd
26	nd	0,01	nd	nd	nd	nd
27	nd	0,01	nd	nd	1,37	nd
Músculo de frango $\mu\text{g kg}^{-1}(\text{pu})$	CLO	BIF	CIA	PER	CIP	DEL
1	nd	<LOQ	<LOQ	nd	0,03	nd
2	nd	<LOQ	nd	nd	0,02	nd
3	0,01	<LOQ	nd	nd	0,04	nd
4	nd	nd	<LOQ	nd	0,02	nd
5	0,08	0,01	nd	nd	0,09	nd
6	nd	nd	<LOQ	nd	0,03	nd
7	nd	0,05	nd	nd	0,04	nd
8	nd	<LOQ	nd	nd	0,01	nd
9	nd	0,01	0,02	0,02	0,04	nd
10	nd	0,05	<LOQ	nd	0,03	nd
11	nd	0,25	nd	nd	0,05	nd
12	nd	0,01	<LOQ	nd	0,16	nd
13	nd	nd	nd	nd	0,01	nd
14	0,03	nd	<LOQ	nd	0,05	nd
15	nd	<LOQ	nd	nd	0,06	nd
16	nd	0,01	0,01	nd	0,01	nd
17	nd	0,01	nd	nd	0,02	nd
18	0,03	0,01	nd	nd	0,03	nd
19	nd	0,02	nd	nd	0,06	nd
20	0,02	<LOQ	nd	nd	0,04	nd
21	0,03	<LOQ	nd	nd	0,02	nd
22	0,01	nd	nd	nd	0,02	nd
23	nd	0,01	nd	nd	0,04	nd
24	nd	0,01	nd	nd	0,03	nd
25	nd	0,03	nd	nd	0,03	nd
26	nd	0,02	nd	nd	0,01	nd
27	nd	nd	nd	nd	0,02	nd
28	nd	0,01	nd	nd	0,01	nd
29	nd	0,01	nd	nd	0,04	nd
30	nd	0,01	<LOQ	nd	0,02	nd
31	nd	<LOQ	nd	nd	0,06	0,01
32	nd	nd	<LOQ	nd	0,03	nd
33	nd	0,01	nd	nd	0,03	nd
34	0,04	<LOQ	nd	nd	0,02	nd
35	nd	0,02	nd	nd	0,04	nd
36	nd	0,08	<LOQ	nd	0,08	nd
37	nd	nd	nd	nd	0,03	nd
38	nd	0,01	nd	nd	0,01	nd

Músculo de frango $\mu\text{g kg}^{-1}(\text{pu})$	CLO	BIF	CIA	PER	CIP	DEL
39	nd	0,01	nd	nd	nd	nd
40	nd	0,14	nd	nd	0,09	0,04
41	nd	0,01	<LOQ	nd	0,02	nd
42	nd	0,02	0,01	nd	0,03	nd
43	nd	0,02	nd	nd	<LOQ	nd
44	nd	0,01	0,03	nd	0,05	nd
45	nd	0,01	nd	nd	0,02	nd
46	nd	0,10	nd	nd	0,02	nd
47	nd	0,01	nd	nd	0,02	nd
48	nd	0,01	<LOQ	nd	0,06	nd
49	nd	0,01	nd	nd	0,01	nd
50	nd	0,01	nd	nd	0,01	nd
51	nd	<LOQ	nd	nd	0,01	nd
52	nd	<LOQ	nd	nd	0,02	nd
53	nd	<LOQ	nd	nd	0,01	nd
Leite $\mu\text{g L}^{-1}$	CLO	BIF	CIA	PER	CIP	DEL
1	nd	nd	0,01	nd	0,01	nd
2	0,02	nd	0,01	nd	0,11	nd
3	0,03	0,03	<LOQ	nd	0,15	nd
4	0,02	0,02	0,02	nd	0,02	nd
5	nd	nd	0,01	nd	0,01	nd
6	nd	0,03	0,25	nd	0,06	nd
7	45,67	0,01	<LOQ	nd	2,75	nd
8	nd	0,09	0,02	nd	0,03	nd
9	0,06	nd	nd	nd	nd	nd
10	0,12	0,01	0,02	nd	0,47	nd
11	2,28	0,11	0,01	nd	0,36	0,02
12	0,04	0,06	<LOQ	nd	0,02	nd
13	1,09	0,06	<LOQ	nd	0,17	0,01
14	0,01	0,01	0,02	nd	0,02	0,04
15	0,06	0,01	0,01	nd	0,01	nd
16	0,21	0,04	0,15	nd	0,04	nd
17	nd	0,07	0,11	nd	nd	0,20
18	0,10	nd	nd	nd	0,05	nd
19	5,85	nd	nd	nd	1,61	nd
20	0,83	nd	nd	nd	1,60	nd
21	0,80	0,07	0,28	nd	0,92	nd
22	0,06	<LOQ	0,01	nd	0,01	nd
23	1,05	0,01	<LOQ	nd	1,15	nd
24	1,97	0,01	0,03	nd	0,02	0,05
25	0,07	nd	<LOQ	nd	0,56	nd
26	0,03	<LOQ	0,01	nd	0,03	nd
27	0,04	0,05	0,01	nd	0,01	nd
28	0,05	<LOQ	nd	nd	0,10	nd

Leite $\mu\text{g L}^{-1}$	CLO	BIF	CIA	PER	CIP	DEL
29	0,10	0,01	0,03	nd	0,15	nd
30	0,01	<LOQ	0,04	nd	<LOQ	nd
31	0,06	0,01	nd	nd	<LOQ	nd
32	0,05	0,01	nd	nd	nd	nd
33	nd	0,01	0,01	nd	0,01	nd
34	nd	0,05	0,01	nd	<LOQ	nd
35	nd	nd	0,01	nd	0,02	nd
36	0,04	nd	nd	nd	0,12	nd
37	nd	0,02	0,06	nd	0,24	nd
38	0,10	nd	nd	nd	0,14	nd
Músculo de peixe $\mu\text{g kg}^{-1}(\text{pu})$	CLO	BIF	CIA	PER	CIP	DEL
1	nd	0,29	nd	nd	0,19	nd
2	nd	<LOQ	nd	nd	0,09	nd
3	nd	0,45	0,01	nd	0,14	nd
4	nd	0,34	<LOQ	nd	0,19	nd
5	nd	0,01	nd	nd	0,11	nd
6	nd	0,15	<LOQ	nd	0,01	nd
7	nd	nd	nd	nd	0,03	nd
8	nd	0,66	0,04	nd	0,03	nd
9	nd	nd	nd	nd	0,03	nd
10	nd	nd	nd	nd	0,11	nd
11	nd	0,64	<LOQ	nd	0,01	nd

pu – peso úmido