



Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia
Departamento de Farmácia (DEFAR)



**Validação de preparo de amostra e de metodologia
analítica para detecção e quantificação de carbendazim em
água**

Victória Rambaldi Matos e Chaib

Ouro Preto/MG
Brasil
2021



Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia
Departamento de Farmácia (DEFAR)



**Validação de preparo de amostra e de metodologia
analítica para detecção e quantificação de carbendazim em
água**

Victória Rambaldi Matos e Chaib

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Elvira Poletti Martucci

Co-orientadora: Raíssa Miranda Costa

Trabalho de Conclusão de Curso apresentando ao curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Ouro Preto/MG

Brasil

2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

C434v Chaib, Victoria Rambaldi Matos e.
Validação de preparo de amostra e metodologia analítica para
detecção e quantificação de carbendazim em água. [manuscrito] /
Victoria Rambaldi Matos e Chaib. - 2021.
51 f.: il.: color., tab.. + Quadro. + Equações.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elvira Poleti Martucci.
Coorientadora: Raíssa Miranda Costa.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto.
Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Cromatografia Líquida. 2. Produtos químicos agrícolas. 3.
Fungicidas. 4. Água potável- Contaminação. I. Costa, Raíssa Miranda. II.
Martucci, Maria Elvira Poleti. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV.
Título.

CDU 543.544.5

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Victória Rambaldi Matos e Chaib

Validação de preparo de amostra e de metodologia analítica para detecção e quantificação de carbendazim em água

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal
de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico Generalista

Aprovada em 15 de dezembro de 2021

Membros da banca

Profª. Drª. Maria Elvira Poleti Martucci - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Profª. Drª. Karina Taciana Santos Rubio - Universidade Federal de Ouro Preto
Drª. Amanda de Vasconcelos Quaresma

Profª. Drª. Maria Elvira Poleti Martucci, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 17/12/2021



Documento assinado eletronicamente por **Maria Elvira Poleti Martucci, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 17/12/2021, às 09:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0260109** e o código CRC **E8BF2734**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.013343/2021-64

SEI nº 0260109

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000
Telefone: 3135591649 - www.ufop.br

Dedicatória

À minha vó Gilda (no coração), por ser o motivo pelo qual eu busco minha melhor versão todos os dias e sempre buscarei para ser seu orgulho. Aos meus pais por serem a definição de amor, apoio e segurança, vocês são meu começo e meu fim, meu orgulho e honra de ser filha de vocês.

Agradecimentos

À Deus, “o Senhor renova as minhas forças e me guia por caminhos certos”, obrigada por ser Sua filha e ter em ti o meu Caminho e a minha Verdade.

Agradeço a benção que é ser filha do Fauze e da Débora, nem nos mais lindos sonhos eu poderia ter mais sorte, vocês são tudo para mim, todo meu coração e paz, meu amor por vocês é muito maior que o infinito.

À vó Gilda (no coração), esse diploma será conquistado para você, você é e sempre será o amor da minha vida, a minha luz.

À Zoe por ser meu anjo.

À minha família, vó Duca, vó Gilcema, vô Rosaldo, vô Zui, Irma, tia Gilze, tio Rui, tio Vando, Gugu, Elize, Henrique e João, por todo apoio e força, por serem meu lar e meu refúgio, eu amo muito vocês.

Ao Matheus, por me trazer equilíbrio, ser amor, morada e paz, obrigada por sempre estar ao meu lado. Todo meu amor e gratidão por você.

À família Brum Rodrigues e Kellermann de Castro, especialmente à Angélica, ao Ricardo e ao Vitinho, por também serem minha família, toda gratidão e amor por vocês.

À Gabi por ser minha melhor amiga da vida, minha voz da razão, que sorte poder caminhar nessa vida com você, te amo.

À Lorena, por ser minha irmã de alma, minha pessoa no mundo, não seria possível sem você, te amo demais.

Ao Lucca, por nenhuma distância abalar nossa amizade, te pâncreas.

À minha orientadora Prof.^a Maria Elvira Poletti Martucci, por todo carinho, paciência, amizade e ensinamentos, por ter sido orientação e luz em todos os momentos, me ajudando e ensinando cada detalhe para que esse trabalho pudesse ser concluído. Muito obrigada por essa oportunidade e apoio, espero ter correspondido com o esperado e poder te retribuir tudo o que você fez por mim.

À minha co-orientadora Raíssa Miranda Costa, por ser leveza e companheirismo em todos os momentos, seu apoio e amizade, que sorte ter tido a honra de trabalhar ao seu lado e aprender com você.

Ao Anderson por ser um ótimo amigo e ter me ensinando tanto, sendo exemplo de dedicação.

Ao Laboratório de Toxicologia por toda oportunidade e poder fazer parte desse time incrível.

À todos os meus amigos do coração, que se tornaram família e que fizeram essa graduação ser o mais feliz possível, meu muito obrigada. Em especial: Virgínia, Júlia, Thaís, Marra, Dilas, Bruna, Luiza, Débora, Carol, Tirana, Bicanca, Donatelo, Polegar, Zipado e Vacilão.

Às minhas duas casas e famílias, Serigy e Penélope, onde eu encontrei muito mais que amigos, mas verdadeiros irmãos, palavras são muito pouco para descrever o que vocês são para mim. Em especial: Parrudo, 6@, Kimba, Alface, Bucho, Januária, Bilbo, Pampers, Laskado, Alejadin, Corega, Sancho, Lila, Kekely, Peret, Nadir, Poney, Brechó, Santana, Barbie, Katana, Devota e O2.

À UFOP por todo conhecimento de qualidade e incentivo à ciência.

Ao CNPQ, PROPP e CAPES pelo apoio financeiro e ter tornado esse projeto viável.

Lista de figuras

<i>Figura 1: Agrotóxicos com maior número de detecções em alimentos in natura.</i>	<i>4</i>
<i>Figura 2: Fórmula estrutural do Carbendazim.</i>	<i>7</i>
<i>Figura 3: Principais metabólitos do Carbendazim.</i>	<i>9</i>
<i>Figura 4: Mecanismo de ação do Carbendazim.</i>	<i>12</i>
<i>Figura 5: Etapas da Extração em Fase Sólida.</i>	<i>13</i>
<i>Figura 6: Esquema de um cromatógrafo líquido.</i>	<i>20</i>
<i>Figura 7: Esquema de um espectrômetro de massas.</i>	<i>21</i>
<i>Figura 8: Esquema da ionização por electrospray (ESI).</i>	<i>23</i>
<i>Figura 9: Cartucho STRATA-XCW 30 mg.</i>	<i>28</i>
<i>Figura 10: Etapa de evaporação sob fluxo de nitrogênio.</i>	<i>29</i>
<i>Figura 11: Curva analítica para as amostras de água.</i>	<i>36</i>
<i>Figura 12: Cromatograma da menor concentração da curva analítica (5 ng/mL), para o carbendazim (a) e para padrão interno (proxifilina) (b), com as respectivas S/N. ...</i>	<i>37</i>
<i>Figura 13: Cromatograma da amostra antes.</i>	<i>40</i>
<i>Figura 14: Cromatograma da amostra controle para avaliação do arraste.</i>	<i>41</i>
<i>Figura 15: Cromatograma da amostra depois.</i>	<i>41</i>

Lista de tabelas

<i>Tabela 1: Características físico-químicas do carbendazim.</i>	<i>8</i>
<i>Tabela 2: Tabela referente ao teste de Grubbs, avaliando a presença de valores aberrantes.</i>	<i>35</i>
<i>Tabela 3: Relação sinal/ruído para o carbendazim e o padrão interno, na concentração de 5 ng/mL.</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 4: Ensaio da repetitividade para obtenção do coeficiente de variação (CV)..</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 5: Cálculos dos critérios utilizados na avaliação dos controles de precisão intermediária.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 6: Relação amostra/área para arraste de amostra do carbendazim.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 7: Rendimento de extração, a concentração nominal (%) e desvio padrão relativo.....</i>	<i>43</i>

Lista de equações

<i>Equação 1: Limite de quantificação.....</i>	<i>16</i>
<i>Equação 2: Desvio padrão relativo.....</i>	<i>16</i>
<i>Equação 3: Precisão intermediária.....</i>	<i>17</i>
<i>Equação 4: Robustez.</i>	<i>18</i>
<i>Equação 5: Exatidão.</i>	<i>18</i>
<i>Equação 6: Concentração do carbendazim.....</i>	<i>32</i>
<i>Equação 7: Cálculo para o G calculado (teste de Grubbs).</i>	<i>32</i>
<i>Equação 8: Equação da reta (curva analítica).....</i>	<i>35</i>
<i>Equação 9: Cálculo da recuperação analítica.</i>	<i>42</i>

Lista de quadros

<i>Quadro 1: Situação regulatória internacional dos dez ingredientes ativos de agrotóxicos mais detectados.....</i>	<i>5</i>
<i>Quadro 2: Principais propriedades físico-químicas dos agrotóxicos com o meio ambiente.....</i>	<i>10</i>
<i>Quadro 3: Seleção de sorvente e eluente adequados para cada tipo de analito.</i>	<i>14</i>

Lista abreviações e siglas

2-AB	2-aminobenzimidazol
5-HBC	5-hidroxi-2-benzimidazol-carbamato
5-HBC-S	2-metoxicarbonil-amino-1H-benzimidazol-5-il-(sulfato de hidrogênio)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Atmospheric pressure Chemical ionization
APPI	Atmospheric pressure photoionization
Benomil	Metil-1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazolcarbamato)
CV	Coeficiente de variação
DPR	Desvio padrão relativo
ESI	Electrospray ionization
FT ICR	Fourier-transformation cyclotron resonance
GM/MS	Ministério da Saúde Gabinete do Ministro
HPLC	High performance liquid chromatography
HRMS	High resolution mass spectrometry
IA	Ingrediente ativo
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICH	International Conference on Harmonisation
IDA	Ingestão diária aceitável
IN	Instrução normativa
IT	Íon trap
LC	Liquid chromatography
LC-HRMS	Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry technique
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry technique
LMR	Limite máximo de resíduo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MALDI	MatrixAssisted Laser Desorption/Ionization
MBC	Metil-2-benzimidazole-carbamato
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MS	Ministério da Saúde
MS	Mass spectrometry
m/z	Razão massa sobre carga de íons
OT	Orbitrap
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PI	Padrão interno
Q	Quadrupolos
RDC	Resolução da diretoria colegiada
S	Desvio padrão
S/N	Razão sinal/ruído
TOF	Time of flight
Ton	Toneladas
T1/2	Tempo de meia vida
U.E.	União Européia
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency
VMP	Valores máximos permitidos
Xi	Valor possivelmente aberrante
Xmédio	Valor médio

Resumo

Com a modernização da agricultura, houve a grande expansão da utilização dos agrotóxicos, com eles vieram as consequências e riscos à saúde humana, do meio ambiente e animal. Com isso tornou-se importante estudar a respeito dessas substâncias e seus efeitos. O carbendazim é um fungicida da classe dos benzimidazóis, que é amplamente utilizado nas culturas de frutas e vegetais no Brasil. Devido esse uso em larga escala a sua presença deve ser avaliada quanto a possíveis riscos. Para isso, é fundamental utilizar metodologia analítica confiável para determinar qualitativamente e quantitativamente a presença de carbendazim em matrizes ambientais. Tendo como objetivo o desenvolvimento do método para subsidiar o monitoramento do carbendazim em água, como proposto por esse estudo. Com o preparo da amostra em extração em fase sólida com diluição direta da matriz e a utilização de um cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado a um espectrômetro de massas (MS) de alta resolução (*Q-Exactive*) foi possível analisar as amostras coletadas, o que gerou resultados mais eficientes e rápidos, com boa seletividade e sensibilidade. A cromatografia líquida de ultra eficiência é uma técnica de separação que apresenta alto rendimento e eficiência, enquanto que a espectrometria de massas de alta resolução é uma técnica que a partir de uma fonte de ionização detecta a razão massa sobre carga de íons (m/z). A fonte de ionização utilizada foi a *electrospray* (ESI) e o tipo de analisador foi *Orbitrap* (OT). O estudo contou com validação do método analítico, o qual demonstrou que o método utilizado para analisar as amostras apresentou repetitividade e precisão intermediária adequadas, com coeficiente de variação inferior a 15%, boa seletividade. A curva analítica demonstrou linearidade com coeficiente de correlação de 0,99, e ausência de valores aberrantes constatado pelo teste de Grubbs. O limite de quantificação do carbendazim foi de 5 ng/mL. Foi considerado robusto com erro relativo de 5,69, não houve arraste de uma amostra para outra e a recuperação foi de 105,9%, dentro da faixa esperada. Dessa forma, foi possível concluir que o método analítico validado tem grande relevância e importância para avaliação da presença do agrotóxico carbendazim em estudos de exposição crônica que envolvam água como matriz.

Palavras-chave: Carbendazim; LC-HRMS; Validação do método analítico.

Abstract

With the modernization of agriculture, there was a great expansion in the use of pesticides, with them harmed and risks to human, environment and animal health. Thus, it becomes important to study about these associations and their effects. Carbendazim is a fungicide of the benzimidazole class, which is widely used in fruit and vegetable crops in Brazil. Due to its large-scale use, its presence must be evaluated for possible risks. For this, it is essential to use a reliable analytical methodology to qualitatively and quantitatively determine the presence of carbendazim in environmental matrices. Aiming at developing a method to support the monitoring of carbendazim in water, as proposed in this study. With the sample preparation in solid phase extraction with direct matrix dilution and the use of an ultra efficient liquid chromatograph coupled to a high resolution mass spectrometer (MS) (Q-Exactive) it was possible to analyze the collected samples, the which generated more efficient and faster results, with good selectivity and sensitivity. Ultra-efficiency liquid chromatography is a separation technique that presents high performance and efficiency, while high-resolution mass spectrometry is a technique that, from an ionization source, detects the mass to ion charge ratio (m/z). The ionization source used was electrospray (ESI) and the analyzer type was Orbitrap (OT). The study included validation of the analytical method, which demonstrated that the method used to analyze the samples presented adequate repeatability and intermediate precision, with a coefficient of variation below 15%, good selectivity. The analytical curve showed linearity with a correlation coefficient of 0.99, and the absence of aberrant values verified by the Grubbs test. The limit of quantification for carbendazim was 5 ng/mL. It was considered robust with a relative error of 5.69, there was no dragging from one

sample to another and the recovery was 105.9%, within the expected range. Thus, it was possible to conclude that the validated analytical method has great relevance and importance for evaluating the presence of the pesticide carbendazim in chronic exposure studies involving water as a matrix.

Key-Words: Carbendazim; LC-HRMS; Analytic Method Validation.

Sumário

1. REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 UTILIZAÇÃO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL.....	1
1.2 LEGISLAÇÃO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL	2
1.3 CARBENDAZIM	2
1.4 TOXICIDADE DOS FUNGICIDAS DA CLASSE DOS BENZIMIDAZÓIS	13
1.5 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	15
1.6 VALIDAÇÃO ANALÍTICA	17
1.6.1 SELETIVIDADE	18
1.6.2 LINEARIDADE OU CURVA ANALÍTICA.....	18
1.6.3 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	19
1.6.4 REPETIBILIDADE.....	19
1.6.5 REPRODUTIBILIDADE OU PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	19
1.6.6 ARRASTE.....	20
1.6.7 ROBUSTEZ	20
1.6.8 EXATIDÃO OU RECUPERAÇÃO.....	21
1.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS).....	21
2. OBJETIVOS	26
3. METODOLOGIA.....	27
3.1 SOLVENTES E REAGENTES	27
3.1.1 SOLUÇÕES	27
3.1.1.1 SOLUÇÃO DE METANOL/ÁCIDO FÓRMICO 95:5	27
3.1.1.2 SOLUÇÃO DE METANOL/HIDRÓXIDO DE AMÔNIO 95:5	28
3.1.1.3 SOLUÇÃO DE ÁGUA/METANOL 7:3 COM 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO	28
3.1.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	28
3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	28
3.3 ANÁLISE INSTRUMENTAL	30
3.4 VALIDAÇÃO	32
3.5 TRATAMENTO DOS DADOS.....	33

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	37
4.1.1 SELETIVIDADE	37
4.1.2 CURVA ANALÍTICA	38
4.1.3 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	41
4.1.4 REPETITIVIDADE	42
4.1.5 PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.....	43
4.1.6 ARRASTE.....	44
4.1.7 ROBUSTEZ	47
4.1.8 RECUPERAÇÃO.....	48
5. CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1. Revisão de Literatura

1.1 Utilização de agrotóxicos no Brasil

A partir da década de 60 houve uma promoção de políticas a fim de modernizar a agricultura, diversas tecnologias foram implantadas, como o agrotóxico. (CAMPANHOLA et al., 2003). Sendo este, peça fundamental para o desenvolvimento das culturas em commodities e em agroenergia (BOMBARDI, 2017). A implantação dos mesmos visava o aumento da produtividade da agricultura, contudo seu uso indiscriminado e generalizado acabou gerando resíduos nos alimentos, contaminação dos solos e águas, efeitos em organismos não-alvo e intoxicação de trabalhadores rurais (CAMPANHOLA et al., 2003).

Devido à rápida expansão do mercado de agrotóxicos, a qual apresentou um ritmo de crescimento maior que o dobro do mundial, em 2008, o Brasil atingiu o primeiro lugar como consumidor mundial de agrotóxicos (RIGOTTO et al., 2014), consumindo cerca de 20% de todo o agrotóxico comercializado mundialmente (PALAEZ et al., 2015). Os herbicidas representam a maior porcentagem de comercialização, sendo de 61,69%, correspondendo a aproximadamente 338 mil toneladas de ingrediente ativo (IA), tendo como principais representantes o glifosato em primeiro lugar, contabilizando aproximadamente 195 mil ton de IA; o 2,4-D, que corresponde a 48 mil ton de IA; a atrazina com 28 mil toneladas comercializadas; o dicloreto de paraquate com 13 mil toneladas de IA. Seguido pelos fungicidas, com 13,35%, sendo aproximadamente 73 mil ton de IA, essa classe pode ser representada pelo mancozebe, com 40 mil ton de IA, pelo óleo mineral com 9 mil toneladas de IA e pelo oxicloreto de cobre com 8 mil toneladas de IA. E os inseticidas, com 10,43%, relativo a aproximadamente 57 mil ton de IA, representados pelo acefato com 24 mil toneladas comercializadas, pelo enxofre com 10 mil toneladas de IA e pelo imidaclorido com 10 mil toneladas comercializadas. e as outras classes de agrotóxicos que somam 14,53%, cerca de 79.818,39 ton de IA (IBAMA, 2018).

Dentre as culturas de alimentos, a soja, o milho e a cana são responsáveis por dois terços de todo agrotóxico comercializado no Brasil, somando cerca de 72% (BOMBARDI,2017), com destaque para o consumo de herbicidas, que pode chegar a 90% da quantidade total de agrotóxicos consumido (CAMPANHOLA et al., 2003). É importante observar que as regiões com maior utilização de agrotóxicos coincidem

com a localização das maiores monoculturas de soja, milho, cana, cítricos, algodão e arroz. Neste sentido, podemos destacar o Mato Grosso como maior consumidor de agrotóxico do Brasil, com 18,9%, seguido de São Paulo (14,5%), Paraná (14,3%), Rio Grande do Sul (10,8%), Goiás (8,8%), Minas Gerais (9,0%), Bahia (6,5%), Mato Grosso do Sul (4,7%) e Santa Catarina (2,1%) (CARNEIRO et al., 2015).

Na classe dos fungicidas benzimidazóis, o Carbendazim é o ingrediente ativo mais utilizado, tendo sido o 15º mais vendido no Brasil dessa classe em 2014, com 5.141 toneladas vendidas (COSTA, 2017).

O carbendazim pertence ao grupo dos fungicidas benzimidazóis e age combatendo diversas doenças, como as causadas pelos fungos Ascomicetos spp., Basidiomicetos, Deuteromicetos spp., *Guignardia citricarpa* e *Colletotrichum acutatum*. Seu uso é indicado para culturas de frutas e vegetais, principalmente algodão, citros, feijão, soja e trigo (COUTINHO et al., 2006).

A maior comercialização de carbendazim no Brasil ocorre no centro-oeste com 36% e no Sul com 25%, sendo os principais estados, Mato Grosso do Sul com 15,8%, Goiás com 13,7%, Paraná com 14,5% e Rio Grande do Sul com 8,5%. Esses percentuais estão diretamente ligados às altas produções de milho, soja, trigo, algodão e arroz por esses estados, culturas nas quais o carbendazim é comumente utilizado (ANVISA, 2019).

Devido sua ampla utilização, principalmente em culturas de alimentos base da alimentação do brasileiro, é importante e necessário um controle e uma regulamentação dos agrotóxicos no Brasil (COSTA, 2017; COUTINHO et al., 2006).

1.2 Legislação de agrotóxicos no Brasil

Atualmente, no Brasil, são autorizados - pelo Ministério da Saúde (MS), pelo Ministério de Meio Ambiente (MMA) e registrados pelo Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) cerca de 430 ingredientes ativos (IA), 750 produtos técnicos e 1.400 formulações de agrotóxicos. Contudo, segundo a ANVISA, dos 50 agrotóxicos mais usados na agricultura, 22 são proibidos na União Europeia. Essas proibições se dão devido ao alto grau de toxicidade dos ingredientes ativos, que podem causar problemas neurológicos, reprodutivos, desregulação hormonal, bem como câncer (ANVISA, 2011).

O decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002 regulamenta a Lei 7.802, de 11 de julho de 1989, chamada de lei dos agrotóxicos, que estabelece as condutas referentes à avaliação dos agrotóxicos, discorrendo sobre a ciência da substância, como a pesquisa e a experimentação, bem como a produção e suas etapas subsequentes, sendo elas a embalagem, rotulagem, transporte e armazenamento. Também estabelece regras para a comercialização, bem como a importação e exportação; a propaganda comercial envolvida; dispõe sobre a utilização; sobre o destino final dos resíduos e embalagens; registro; classificação; controle, inspeção e fiscalização; dando por fim providências cabíveis a cada situação com os agrotóxicos e seus componentes. Além disso, determina a eficiência agrônômica do produto e sua possível toxicidade à saúde humana e ao meio ambiente.

A aprovação do agrotóxico é determinada pelos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), bem como o do Meio Ambiente - que tem como órgão responsável o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) (pelo Decreto 4.074/02) - e pelo Ministério da Saúde, que tem como órgão responsável a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (pelo Decreto 4.074/02). Portanto, um determinado agrotóxico só pode ser utilizado no país após ter sido registrado em órgão federal competente.

É importante destacar que a criação da ANVISA em 1999 melhorou a regulação dos agrotóxicos e de seus testes toxicológicos, mas ainda existem dificuldades no que se refere à retirada de produtos que oferecem riscos à saúde humana por apresentarem, por exemplo, potencial carcinogênico e imunotóxico, bem como oferecem riscos ambientais (CARNEIRO et al., 2015).

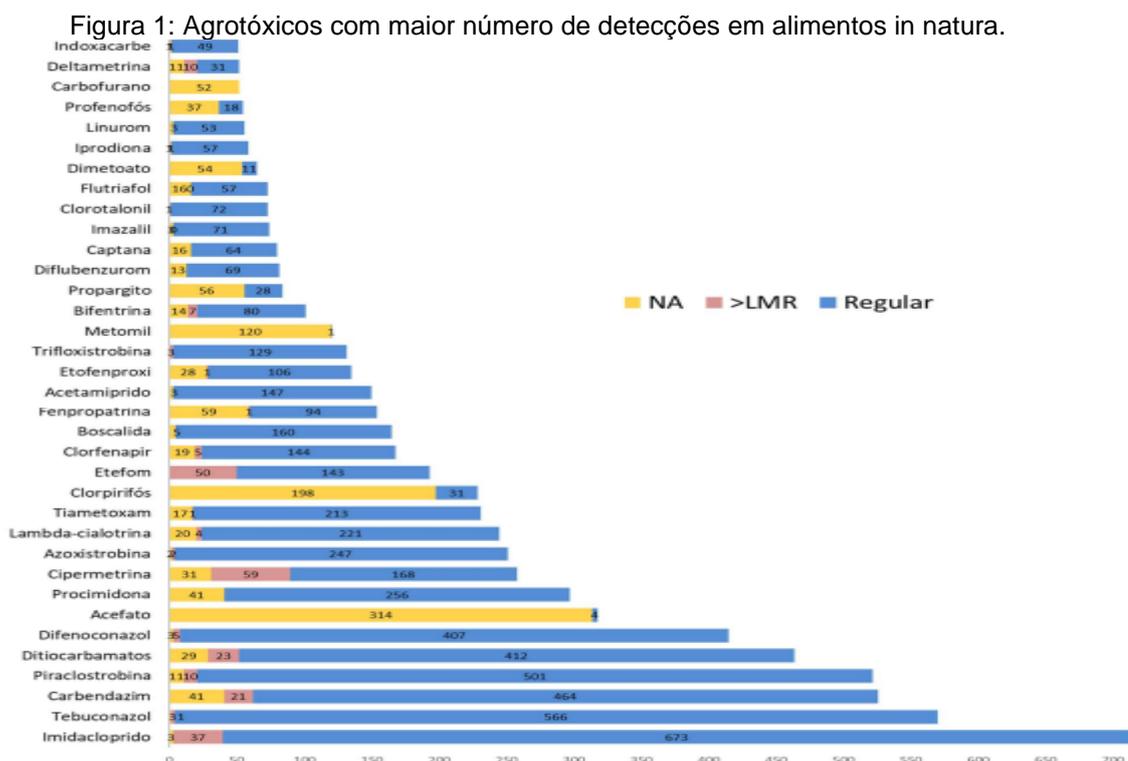
A avaliação toxicológica, feita pela ANVISA, também permite calcular a Ingestão Diária aceitável (IDA) de cada ingrediente ativo (IA), bem como estabelecer o Limite Máximo de Resíduo (LMR) e o Intervalo de Segurança (ANVISA, 2013). Estas avaliações toxicológicas são realizadas individualmente, considerando a exposição a cada agrotóxico e, desconsiderando os possíveis efeitos acumulados de exposição a mais de uma substância ou a uma formulação comercial que apresente mais de um ingrediente ativo, demonstrando assim uma defasagem na legislação (CARNEIRO et al., 2015).

Ao compararmos o Limite Máximo de Resíduo (LMR) em alimentos no Brasil com o LMR da União Europeia (UE), observamos que a utilização do herbicida 2,4-D é duas vezes maior nas culturas de soja e arroz brasileiras, variando respectivamente

de 0,05 mg/kg para 1 mg/kg e 0,1 mg/kg para 0,2 mg/kg, já na cultura do milho essa diferença chega a quatro vezes, sendo de 0,05 mg/kg na UE e 0,2 mg/kg no Brasil. Quando se trata do herbicida atrazina, que é o 7º agrotóxico mais utilizado no Brasil, mas que está proibido na UE desde 2004, a utilização chega a ser 5 vezes maior, variando de 0,05 mg/kg para 0,25 mg/kg nas culturas de cana-de-açúcar, milho e sorgo (BOMBARDI, 2017).

É possível observar uma grande discrepância quanto aos LMR estabelecidos pela EU e pelo Brasil. O Brasil tem valores médios de LMR 200 vezes superiores à EU, essa diferença pode chegar até 5000 vezes (BOMBARDI, 2017).

De acordo com o último relatório das amostras analisadas no período de 2017/2018 do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), foi feita a detecção de 122 ingredientes ativos em 4616 amostras, contabilizando um total de 8.270 detecções. Os ingredientes ativos que mais foram identificados foram imidacloprido, tebuconazol e carbendazim. O carbendazim foi detectado em 526 amostras, cerca de 11% das amostras avaliadas. Como demonstrado na figura 1 foi um dos ingredientes ativos mais detectados. Os resíduos de carbendazim podem ter sido provenientes do tiofanato-metílico, que se converte em carbendazim, por isso esses resíduos também foram contabilizados.



Fonte: ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA), 2019.

Muitos agrotóxicos disponíveis para utilização no Brasil não são permitidos em outros países, como observado no quadro 1.

Quadro 1: Situação regulatória internacional dos dez ingredientes ativos de agrotóxicos mais detectados.

Ingrediente Ativo	Brasil	Europa	EUA	Austrália	Canadá	Japão
Imidacloprido	+	+	+	+	+	+
Tebuconazol	+	+	+	+	+	+
Carbendazim	Reavaliação	-	-	+	-	-
Piraclostrobina	+	+	+	+	+	+
Ditiocarbamatos*	+	+	+	+	+	+
Difenoconazol	+	+	+	+	+	+
Acefato	+ (reavaliado)	-	+	+	+	+
Procimidona	Reavaliação	-	+	+	+	+
Cipermetrina	+	+	+	+	+	+
Azoxistrobina	+	+	+	+	+	+

Nota:

- (1) O símbolo "+" significa que o IA possui uso agrícola autorizado; o símbolo "-" significa que não possui uso agrícola autorizado no país da coluna relacionada.
- (2) O ditiocarbamato considerado foi o mancozebe, 3º ingrediente ativo mais comercializado no Brasil, segundo o último relatório de comercialização emitido pelo Ibama.
- (3) Carbendazim e procimidona foram selecionados para as próximas reavaliações.
- (4) O acefato foi reavaliado e mantido com restrições.

Fonte: ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA), 2019.

A Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021 que alterou o Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5, de 03 de outubro de 2017, do Ministério da Saúde, estabelece os procedimentos de controle e vigilância da qualidade de água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, determinado a partir das amostras coletadas, a quantidade de agrotóxicos presentes nas bacias hidrográficas dos mananciais de contribuição e na sazonalidade das culturas. Essa portaria estabelece também os valores permitidos para substâncias químicas, como os agrotóxicos, limitando de acordo com o risco à saúde. Dentre todos os 497 agrotóxicos que apresentam monografia de uso permitido, somente 40 têm seus valores máximos permitidos (VMP), estabelecidos, somando os próprios agrotóxicos e seus metabólitos (ANVISA, 2021).

Ao compararmos o Limite Máximo de Resíduo para água potável no Brasil especificada na portaria GM MS 888 e na UE, os índices são mais expressivos tendo em vista a grande diferença na quantidade permitida desses agrotóxicos e em alguns casos até a falta de um limite estabelecido. O fungicida benzimidazólico carbendazim

apresenta um LMR 1200 vezes maior no Brasil, variando de 0,1 µg/L na UE para 120 µg/L no Brasil (BOMBARDI, 2017; PORTARIA GMMS 888).

Além disso, há outras regulamentações relacionadas aos agrotóxicos: Lei 12.873/13 e o decreto 8.133/13. Estas se referem à autorização emergencial de agrotóxicos, ou seja, em caso de situação epidemiológica de risco iminente de surto de epidemia ou praga quaternária, foi concedido ao Poder Executivo Federal declarar estado de emergência fitossanitária ou zoonosológica e, assim, autorizar o uso de agrotóxicos, inclusive aqueles ainda não aprovados no Brasil. Contudo, essas regulamentações têm algumas oposições, devido à violação de um ponto importante da Lei 7.802/89, que determina que a avaliação de um agrotóxico seja, obrigatoriamente, feita pelos órgãos da agricultura, saúde e meio ambiente. No caso dessas regulamentações, apenas o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) poderia autorizar a importação, produção, comercialização e uso dos agrotóxicos.

Outra norma importante para o âmbito da legislação dos agrotóxicos é a RDC nº 294/19, a qual dispõe sobre os critérios para avaliação e classificação toxicológica, priorizando a avaliação de risco por meio de uma análise sistemática do aparecimento de efeitos adversos após a exposição humana aos agrotóxicos e seus componentes (PARA, 2019; RDC nº 294/19).

Subsequente à RDC nº 294/19, tem-se a RDC nº 295/19 que dispõe a respeito dos critérios para avaliação do risco dietético agudo ou crônico devido à exposição humana aos resíduos de agrotóxicos e seus componentes nos alimentos. Essa avaliação é feita considerando os resíduos dos ingredientes ativos, dos metabólitos e dos produtos de degradação (PARA, 2019; RDC nº 294/19).

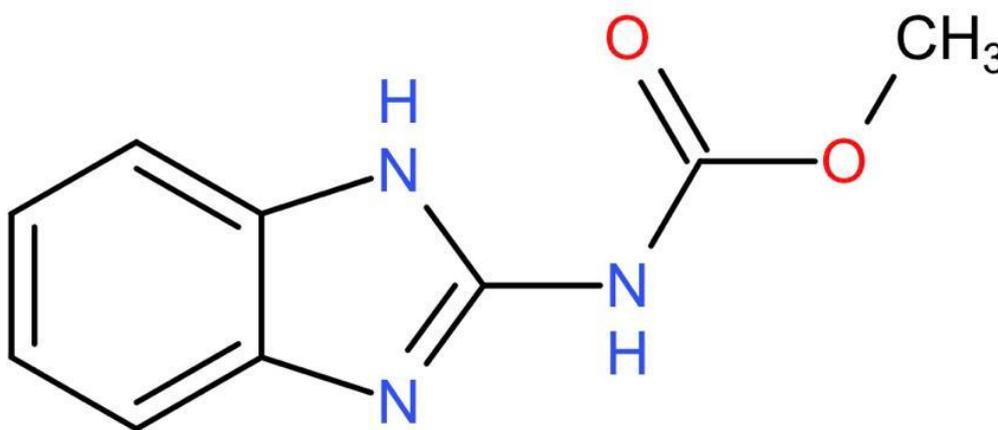
Para tentar minimizar os riscos advindos dos agrotóxicos, os rótulos e bulas das embalagens desses produtos devem conter informações a respeito do perigo, bem como advertências e frases de perigo, determinadas de acordo com a classe e categoria de cada substância, premissas essas estabelecidas pela RDC nº 296/19 (PARA, 2019; RDC nº 296/19).

A Resolução Normativa nº 34/19 publicou a lista dos componentes - que de acordo com sua avaliação e classificação toxicológica, bem como comparações das ações toxicológicas dos agrotóxicos, seus componentes e afins - não devem ser utilizados em agrotóxicos (PARA, 2019; IN nº 34/19).

1.3 Carbendazim

O Carbendazim é o ingrediente ativo do grupo dos fungicidas benzimidazólicos mais utilizado atualmente. Apresenta como nomenclatura oficial metil-2-benzimidazole-carbamato (MBC) e fórmula molecular $C_9H_9N_3O_2$. Sua fórmula estrutural é demonstrada na figura 2 (SILVA et al., 2014).

Figura 2: Fórmula estrutural do Carbendazim.



Fonte: Adaptado do autor SILVA et al., 2014.

O Carbendazim é um sólido cristalino branco com massa molar de $191,2 \text{ g mol}^{-1}$. Tem como propriedades físico-químicas principais as apresentadas na tabela 1 (COUTINHO et al., 2006).

Tabela 1: Características físico-químicas do carbendazim.

Propriedade Físico-Química	Características
Pressão de vapor	Menor que 1×10^{-7} Pa, na temperatura de 20°C
Ponto de Fusão	250°C
Densidade	0,27g/mL
Coefficiente de partição n-octanol-água	1,49
Constante de Henry	20°C de $1,02 \times 10^{-9}$ atm m ³ mol ⁻¹
Solubilidade em água	pH 4 é de 28,0 mg/L pH 7 é de 8 mg/L pH 8 é de 7 mg/L
Solubilidade em solventes orgânicos	300 mg/L em etanol e acetona 100 mg/L em clorofórmio 36 mg/L em benzeno 0,5 mg/L em hexano

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Outro parâmetro importante a ser considerado quando se refere ao MBC é seu tempo de meia vida ($t_{1/2}$), que no meio ambiente é de dois meses em condições aeróbias e até 25 meses em condições anaeróbias (SILVA et al., 2014).

A ($t_{1/2}$) é um ponto importante a ser considerado, uma vez que está diretamente ligada a degradação do ingrediente ativo e formação dos seus metabólitos. A degradação do carbendazim é lenta o que o configura o como um composto estável. Contudo, na presença de luz, pode ocorrer a fotodegradação, bem como pode ocorrer instabilidade devido às mudanças na temperatura e pH do meio. Essa instabilidade altera a velocidade da degradação, a qual é mais rápida em meio alcalino (SILVA et al., 2014).

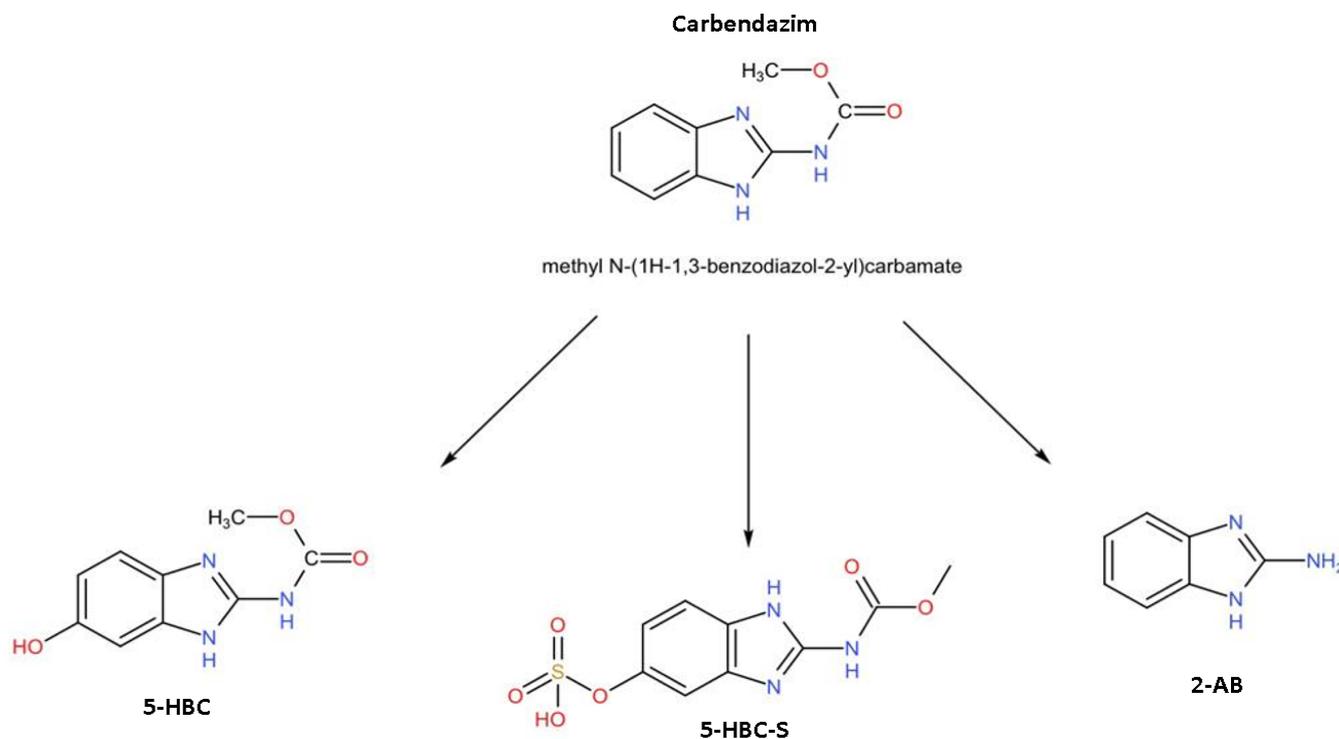
Quando os agrotóxicos entram em contato com o meio eles entram em um processo de biodegradação que vai levar a formação dos seus metabólitos, esse processo pode ocorrer por meio da ação de microrganismos aeróbios ou anaeróbios que estão presentes na água e no solo, da fotólise ou fotodecomposição devido a exposição à radiação, ou ainda, por meio da hidrólise (HOLVOET et al., 2007).

O carbendazim pode gerar como principais metabólitos o 2-aminobenzimidazol (2-AB), 5-hidroxi-2-benzimidazol-carbamato (5-HBC) e 2-metoxicarbonil-amino-1H-benzimidazol-5-il-(sulfato de hidrogênio) (5-HBC-S), como demonstrado na figura 3 (IUPAC 2021).

O 5-HBC é um dos principais produtos da hidroxilação do carbendazim (reação de fase I) (APVMA, 2009), enquanto que o 2-AB é oriundo da degradação do

carbendazim a partir da perda do grupo metoxicarbonil, resultando numa amina primária ligada ao benzimidazol (COUTINHO et al., 2006). O 5-HBC-S é formado por meio da reação de sulfatação do metabolismo de fase II na hidroxila do 5-HBC.

Figura 3: Principais metabólitos do Carbendazim.



Fonte: Elaborado pela autora tendo como referência Coutinho et al., 2006.

A presença do Carbendazim e dos seus metabólitos no meio ambiente, principalmente na água está diretamente relacionada com as propriedades físico-químicas, como a solubilidade em água, o coeficiente de adsorção da matéria orgânica do solo, a constante da Lei de Henry e o tempo dessas substâncias no solo e na água (PEREIRA, 2018).

Outro parâmetro físico-químico de importante avaliação é o coeficiente Kow, que está relacionado à hidrofobicidade do composto, os compostos que apresentam log Kow menor que 2,5 apresentam características hidrofílicas, o que se encaixa no perfil do carbendazim, apresentando grande potencial de difusão nos ambientes aquosos (PEREIRA, 2018).

As principais propriedades físico-químicas dos agrotóxicos e sua relação com o meio ambiente são expostas no quadro 2.

Quadro 2: Principais propriedades físico-químicas dos agrotóxicos com o meio ambiente.

PROPRIEDADES	IMPORTÂNCIA
Solubilidade em água	Indica a possibilidade de carreamento do composto em águas de chuva/irrigação, associação deste ao solo e mobilidade em aquíferos e águas superficiais.
Coefficiente de partição octanol-água (K_{ow})	Estima a hidrofobicidade ou tendência à partição do composto em uma fração (sólida ou líquida) de baixa polaridade.
Coefficiente de adsorção normalizado em função do conteúdo orgânico (K_{oc})	Estima a adsorção de substâncias ao conteúdo orgânico, determinando a mobilidade no solo.
Constante adimensional de Henry (K'_{H})	Indica a tendência à volatilização para compostos com $K'_{H} > 10^{-4}$. A partir desta, pode-se obter a relação K'_{H}/K_{ow} , que indica a tendência de retenção da substância em partículas em fase sólida ou líquida.
Constante de dissociação ácida (K_a)	Indica a acidez, ou seja, a capacidade do composto em liberar prótons (H^+) em solução aquosa, confirmando a especiação do composto.
Tempo de meia-vida	É o tempo necessário para que a quantidade inicial do composto se reduza em 50% devido às reações de hidrólise.

$$*K'_{H} = K_{H} \cdot R \cdot T$$

Fonte: Pereira, 2018.

Para avaliar a presença do carbendazim e sua ação no meio ambiente, deve-se avaliar a presença do benomil (Metil 1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazolcarbamato) também, já que o benomil, um fungicida da classe dos benzimidazóis, bastante instável no meio, tem como principal subproduto o carbendazim (ZAMORA et al., 2009).

Devido essa presença e relação do carbendazim e seus metabólitos, bem como seu papel como metabólito do benomil no meio ambiente, é importante uma avaliação e estudo a respeito de sua toxicidade tanto para o meio quanto à população (RIGOTTO et al., 2014).

1.4 Toxicidade dos fungicidas da classe dos benzimidazóis

A presença de agrotóxicos no meio ambiente é uma questão de saúde pública, uma vez que a intoxicação por meio destes e dos seus metabólitos é passível de ocorrer até pela ingestão de alguns alimentos. Quando se refere à intoxicação causada pelo carbendazim, a mesma tem sido associada a alimentos como feijão, arroz, trigo, soja, citros, que são as lavouras que compõem a alimentação básica do brasileiro (RIGOTTO et al., 2014).

A intoxicação pelo carbendazim é mais recorrente e mais séria quando se avalia trabalhadores rurais, uma vez que a exposição é muito maior quando comparado a exposição por meio da alimentação (RIGOTTO, et al., 2014).

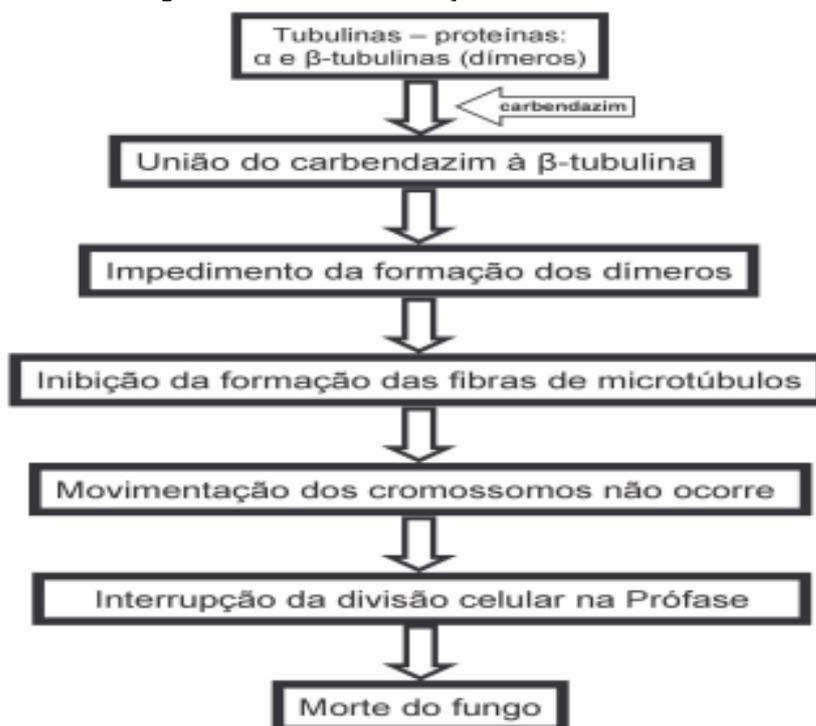
Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a U.S. *Environmental Protection Agency* (EPA), o MBC é um fungicida de classe toxicológica III, o que caracteriza uma toxicidade média e faz parte do grupo C, como possível carcinógeno em humanos (ANVISA 2021; EPA 2016).

A toxicidade está associada a casos de mutagenicidade, neoplasias hepatocelulares em camundongos, atividade tumoral em células ovarianas em humanos (SILVA et al., 2014). O benomil, que pode gerar o carbendazim como metabólito, também apresenta efeitos nocivos ao desenvolvimento e fertilidade humana e desregulação no sistema endócrino humano (IUPAC, 2021).

Os fungicidas da classe dos benzimidazóis estão entre as classes mais usadas e conhecidas no controle de fitopatógenos. Têm como principais representantes o benomil, o tiofano-metílico, o tiobendazol e o carbendazim, os quais são fungicidas sistêmicos e atuam com uma alta seletividade na interrupção do ciclo celular dos fungos. O tiobendazol foi o primeiro fungicida dessa classe a ser desenvolvido e a princípio era utilizado como vermífugo humano e veterinário (SILVA et al., 2014).

A classe dos benzimidazóis, a qual o carbendazim pertence, tem como forma de atuação a inibição de proteínas específicas nos fungos, α e β tubulinas, que ao sofrerem polimerização, dão origem aos microtúbulos. A formação desses microtúbulos pode ser inibida pela ação de fungicidas como o carbendazim. Essa inibição impede a divisão das células, que passam a ser multinucleadas e geram a morte do fungo (COUTINHO et al., 2006; SILVA et al., 2014). O mecanismo de ação do carbendazim é esquematizado pela figura 4.

Figura 4: Mecanismo de ação do Carbendazim.



Fonte: Coutinho et al., 2006.

Os fungicidas benzimidazólicos têm um problema relacionado com a alta taxa de resistência desenvolvida pelos organismos, essa resistência pode ser desenvolvida por alguma mutação que diminua a força da ligação do agrotóxico com a tubulina, sem afetar o funcionamento da mesma. Essa resistência adquirida pelos fungos se dá pela ampla utilização dos fungicidas dessa classe, pelo modo de ação seletivo que ele age (inibição das proteínas específicas dos fungos) e além disso os fungos já tem naturalmente uma linhagem resistente em sua população (GHINI, 1987).

A contaminação pelo carbendazim está relacionada também com o tempo e a temperatura, bem como o conteúdo de matéria orgânica e materiais argilosos presentes no solo, podendo manter sua permanência no solo devido a interação com os coloides (KARLING et al., 2011).

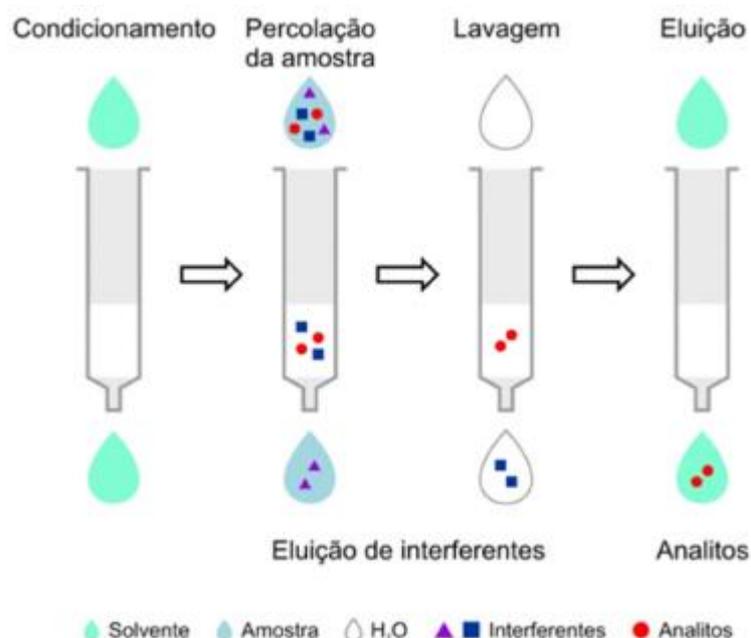
1.5 Preparo das amostras

O preparo da amostra é realizado para que qualquer interferente que possa atrapalhar a análise da substância desejada, seja eliminado. Para esse procedimento é realizado o isolamento e a concentração do analito desejado (MORAIS et al., 2013).

Existem diversas técnicas para realização do preparo da amostra como extração líquido-líquido, extração em fase sólida e microextração em fase sólida. A técnica de extração em fase sólida tem sido usada amplamente em amostras líquidas pela sua alta capacidade de concentrar os solutos nos extratos, a redução no consumo de solventes orgânicos e a facilidade de automação (NOVAIS et al., 2015).

A extração em fase sólida é uma técnica utilizada para separar o analito de interesse em uma matriz complexa, essa separação líquido-sólido é baseada no mecanismo de separação da cromatografia líquida de baixa pressão. As etapas desse tipo de preparo de amostra incluem o condicionamento do sorvente, seguida da adição da amostra, remoção dos interferentes e por fim a eluição do analito, como observado na figura 5 (CALDAS et al., 2011).

Figura 5: Etapas da Extração em Fase Sólida.



Fonte: Caldas et al., 2011.

A extração em fase sólida começou a ser utilizada em 1976, apresentando diversas vantagens frente a extração líquido-líquido. Além de apresentar uma grande aplicação em diversos campos de estudo, a extração em fase sólida apresenta facilidade de automação, disponibilidade comercial de equipamentos e solventes, utilização reduzida de solventes orgânicos, menores volumes de resíduos tóxicos, não apresenta a formação de emulsões, tem uma maior seletividade e maior concentração do analito de interesse. Em contrapartida essa técnica apresenta como desvantagens o alto custo dos equipamentos, como cartuchos e dispositivos multivias, os cartuchos

são comumente descartáveis o que diminui a reprodutibilidade entre diferentes lotes, além disso requer um tempo prolongado de análise e apresenta dificuldades na seleção de sorvente adequado para a aplicação (JARDIM, 2010).

Um dispositivo importante na técnica de extração em fase sólida é o cartucho, os quais apresentam diferenças quanto ao volume de amostra que suportam, tipo de sorvente, eluição do analito e volumes de solventes para ativação, podendo ser na forma de seringa ou barril (JARDIM, 2010). Para realizar o isolamento e preparo da amostra, a mesma é passada pelo cartucho que contém o sorvente, onde ficam retidos o analito para posterior eluição com o solvente orgânico adequado (CALDAS, 2011).

Para cada analito e suas propriedades tem um tipo mais adequado de mecanismo, sorvente (fase sólida), tipo de matriz e eluente do analito, como está demonstrado no quadro 3.

Quadro 3: Seleção de sorvente e eluente adequados para cada tipo de analito.

Mecanismo	Sorvente	Tipo de Analito	Tipo de Matriz	Eluente do Analito
apolar (fase reversa) partição e adsorção	C18, C8, C2, cicloexil, fenil, cianopropil, poli-mérico	grupos funcionais apolares como alquilas e aromáticos	soluções polares (tampão aquoso)	solventes polares como metanol, acetone nitrila e água com pH ajustado
polar (fase normal) partição e adsorção	Sílica, diol, ciano, aminopropil, diamino	grupos funcionais polares como aminas e hidroxilas	solventes apolares, óleos	solventes apolares como hexano e diclorometano
troca catiônica	forte (ácido sulfônico) ou fraco (ácido carboxílico)	grupos funcionais carregados positivamente como aminas	aquosa, força iônica baixa	tampão como acetato, citrato e fosfato
troca aniônica	forte (tetra alquilamônio) ou fraco (amino)	grupos funcionais carregados negativamente como ácidos orgânicos	aquosa, força iônica baixa	tampão como fosfato e acetato

Fonte: Jardim, 2010.

Dessa forma ao escolher adequadamente os componentes para cada tipo de analito, é possível efetuar um preparo de amostra eficiente, o que favorecerá a técnica cromatográfica utilizada posteriormente, garantindo eficácia e precisão ao método (CONLEY et al., 2008).

1.6 Validação analítica

A validação tem como função avaliar a eficácia do método analítico e sua confiabilidade. Para analisar e garantir os resultados confiáveis do método escolhido, são utilizados alguns parâmetros, como: especificidade/seletividade, função da

resposta (curva analítica), linearidade, limite de detecção, sensibilidade, exatidão, precisão, robustez e limite de quantificação (BRITO et al., 2003).

Para que a etapa de validação seja realizada com sucesso é necessário que as condições sejam adequadas, como profissionais qualificados, aparelhos calibrados, padrões e reagentes de qualidade e dentro do prazo de validade, para que dessa forma o método esteja dentro dos parâmetros esperados e podendo garantir a qualidade nas análises, com comparabilidade, confiabilidade e rastreabilidade (DIAS et al., 2019).

1.6.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade de detectar e quantificar o analito de interesse independente da presença de interferentes contidos na matriz (ANVISA, 2017). Dessa forma, ao obter um espectro e esse apresentar diversos sinais, mas conseguir identificar o analito de interesse conclui-se que o método é seletivo (DIAS et al., 2019).

Para analisar a seletividade deve-se comparar a matriz com o analito de interesse em uma concentração conhecida, denominado padrão, com a matriz sem o analito de interesse. Considera-se um método seletivo se nenhum interferente eluir no tempo de retenção da substância de interesse, a qual deve estar bem separada dos outros componentes da amostra (RIBANI, et al., 2004).

1.6.2 Linearidade ou curva analítica

A linearidade de um método analítico está relacionada a capacidade deste de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse (ANVISA, 2017).

Para determinar a linearidade é montado um gráfico com diferentes concentrações do analito (eixo x), a partir de cada concentração é obtido um sinal analítico (eixo y), formando assim uma curva analítica. Essas duas variáveis são relacionadas por meio da equação da reta: $y = a + bx$, na qual: y é o sinal analítico; x a concentração; a, a interseção com o eixo y; e b, o declive da curva analítica (DIAS et al., 2017).

Para considerar o método linear o coeficiente de relação (R) entre os sinais e as concentrações o valor deve ser acima de 0,99, configurando a baixa dispersão e incerteza (DIAS et al., 2017).

1.6.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma matriz que pode ser quantificada com precisão e exatidão (ANVISA, 2017).

O limite de quantificação pode ser obtido a partir da equação 1.

Equação 1: Limite de quantificação.

$$LQ = \left| \frac{10 \cdot s}{b} \right|$$

Na qual s é o desvio padrão da resposta do branco e b é o coeficiente angular. A relação sinal/ruído deve ser igual a 10:1 (MUNIZ, 2018).

1.6.4 Repetibilidade

A repetibilidade é um parâmetro que avalia a precisão do método analítico, considerando a proximidade entre os resultados obtidos. Esse parâmetro deve seguir os critérios de mesmo analista, mesma instrumentação, em uma mesma corrida analítica (ANVISA, 2017).

De acordo com a ANVISA, deve-se avaliar no mínimo 9 amostras, sendo igualmente divididas em concentrações baixas, médias e altas.

Para avaliar esse parâmetro utiliza-se o desvio padrão relativo (DPR), também denominado coeficiente de variação (CV), o qual é demonstrado na equação 2.

Equação 2: Desvio padrão relativo.

$$DPR (\%) = \frac{S \cdot 100}{Cr}$$

O S é o desvio de repetitividade e o CR é a média entre as concentrações calculadas no ensaio.

1.6.5 Precisão intermediária

A precisão intermediária é um parâmetro que avalia a precisão e a variação dos resultados obtidos em um mesmo laboratório, dessa forma esse parâmetro é analisado alterando uma ou mais condições de análise, como analistas, dias ou equipamentos (MUNIZ, 2018).

A precisão intermediária é realizada semelhante a repetibilidade, ambos parâmetros da precisão de um método analítico, alterando um pouco a equação do desvio padrão, representada a seguir pela equação 3.

Equação 3: Precisão intermediária.

$$DPR (\%) = \frac{Sw \cdot 100}{Cr - pi}$$

Na qual Sw é o desvio da precisão intermediária e CR-PI é a média entre as concentrações calculadas nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

1.6.6 Arraste

Esse parâmetro da validação do método analítico avalia se houve arraste de amostra entre duas análises consecutivas, gerando uma contaminação da amostra. Caso ocorra esse arraste pode levar ao erro e diminuição da eficácia do método, gerando resultados falsos (MUNIZ, 2018).

1.6.7 Robustez

A robustez é um parâmetro que indica a capacidade do método de resistir a pequenas variações analíticas (ANVISA, 2017).

O teste de robustez é realizado para indicar os fatores que podem influenciar na resposta (DIAS, 2019) e o mesmo é avaliado analogamente a repetibilidade e a

precisão intermediária, por meio do cálculo do DPR, como demonstrado na equação 4 abaixo.

Equação 4: Robustez.

$$DPR (\%) = \frac{S \cdot 100}{Cr}$$

O S é o desvio de robustez e o CR é a média entre as concentrações calculadas no ensaio da robustez para cada condição analisada.

1.6.8 Exatidão ou recuperação

A exatidão de um método é avaliada pelo grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação aos valores de referência (ANVISA, 2017).

Para avaliar esse parâmetro são utilizados ensaios de recuperação, no qual devem ser utilizadas no mínimo 9 determinações, sendo igualmente divididas em baixa, média e alta concentração. A exatidão então é uma relação entre a concentração média obtida experimentalmente e a concentração teórica, de referência, como representado na equação 5 a seguir (DIAS, 2018).

Equação 5: Exatidão.

$$Exatidão = \frac{Concentração\ média\ experimental \cdot 100}{Concentração\ teórica}$$

1.7 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS)

As técnicas hífenadas referem-se à utilização concomitante de diferentes métodos para se obter um melhor resultado, de modo que os mesmos se complementam sendo capazes de gerar resultados mais eficientes e rápidos. A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) é um exemplo desta técnica, uma vez que a cromatografia irá realizar a separação e a espectrometria de massas a identificação de uma amostra de interesse (RODRIGUES et al., 2006).

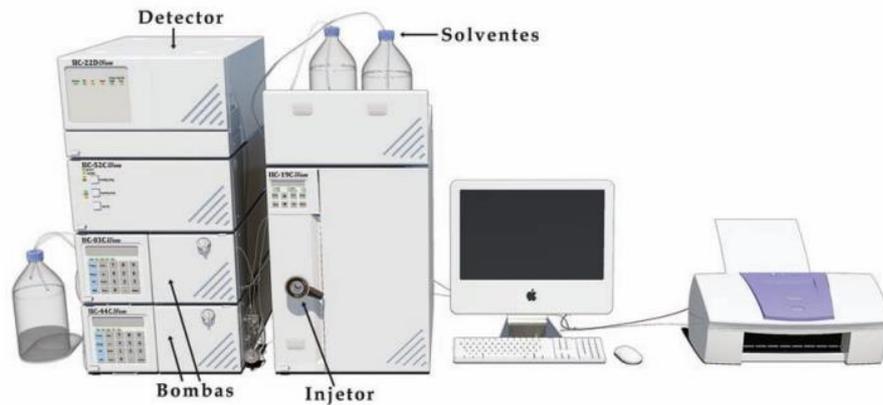
A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) tem sido amplamente empregada na determinação e identificação de amostras ambientais, principalmente de água. A utilização desse tipo de técnica se dá pela sua boa seletividade e sensibilidade. Ao se relacionar a técnica de preparo de amostra, a extração em fase sólida, com a LC-MS, obtém-se uma maior seletividade e sensibilidade (CONLEY et al., 2008).

As técnicas cromatográficas são muito utilizadas quando se refere a separação, principalmente se tratando de amostras complexas, devido sua eficiência e poder de resolução (LANÇAS, 2009).

Ao longo dos anos houve o avanço dessas técnicas, trazendo melhorias para métodos prévios, dessa maneira foi desenvolvida a cromatografia de ultra eficiência, que apresenta maior rendimento e eficiência. Se diferenciando fisicamente quanto ao tamanho das partículas o que melhora o resultado obtido, menor tempo de análise, menores colunas, maiores temperaturas e fluxos sem alterar a eficácia e resolução do método, contudo essa técnica apresenta algumas desvantagens, como a análise qualitativa limitada devido ao tempo de retenção (QUARESMA, 2014).

A forma de separação das técnicas cromatográficas líquidas funciona como demonstrado na figura 6 abaixo. O solvente, que é a fase móvel se mantém reservado em um frasco que no momento da realização da técnica de separação pela cromatografia líquida, é impulsionado por uma bomba de alta pressão para que esse eluente entre na coluna cromatográfica. Antes de ser introduzido na coluna a amostra é adicionada à fase móvel por uma válvula de injeção, então essa fase móvel chega à coluna cromatográfica e é realizada a separação. O que passa pela coluna chega ao detector que irá avaliar a presença dos analitos que foram eluidos da coluna, esse detector irá apresentar o resultado por meio de um sinal, demonstrado no software acoplado, gerando então um cromatograma, obtido pela variação do tempo de análise pelo sinal do detector (LANÇAS, 2009).

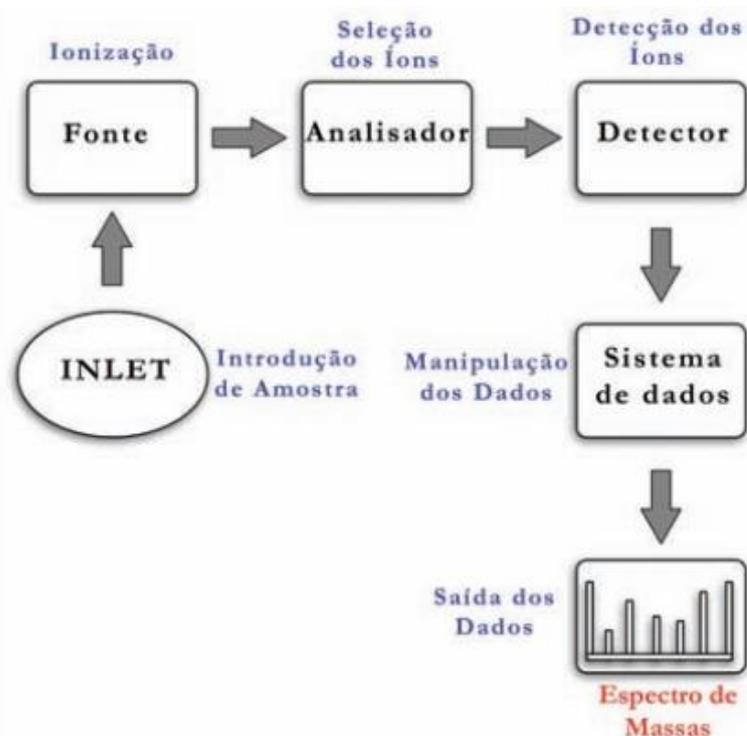
Figura 6: Esquema de um cromatógrafo líquido.



Fonte: Lanças, 2009.

Já a espectrometria de massas é uma técnica que a partir de uma fonte de ionização detecta a razão massa sobre carga de íons (m/z) (ABDELNUR, 2011). O espectrômetro de massas é formado por cinco componentes básicos, como demonstrado na figura 7. A primeira etapa da técnica é a introdução da amostra, a qual dentro do espectrômetro estará em uma pressão mais baixa que a atmosférica, após essa etapa essa amostra irá para a fonte de ionização, componente que transformará as moléculas da amostra em íons na fase gasosa. Após a ionização, esses íons serão acelerados por um campo magnético, para posteriormente um analisador de massas separá-los em razão da massa/carga (m/z). Assim, um detector irá quantificar os íons gerados para que o sistema de dados possa processar e registrar os sinais em forma de um gráfico do número de íons produzidos pela razão massa/carga (MÉDICE, 2017).

Figura 7: Esquema de um espectrômetro de massas.



Fonte: Lanças, 2009.

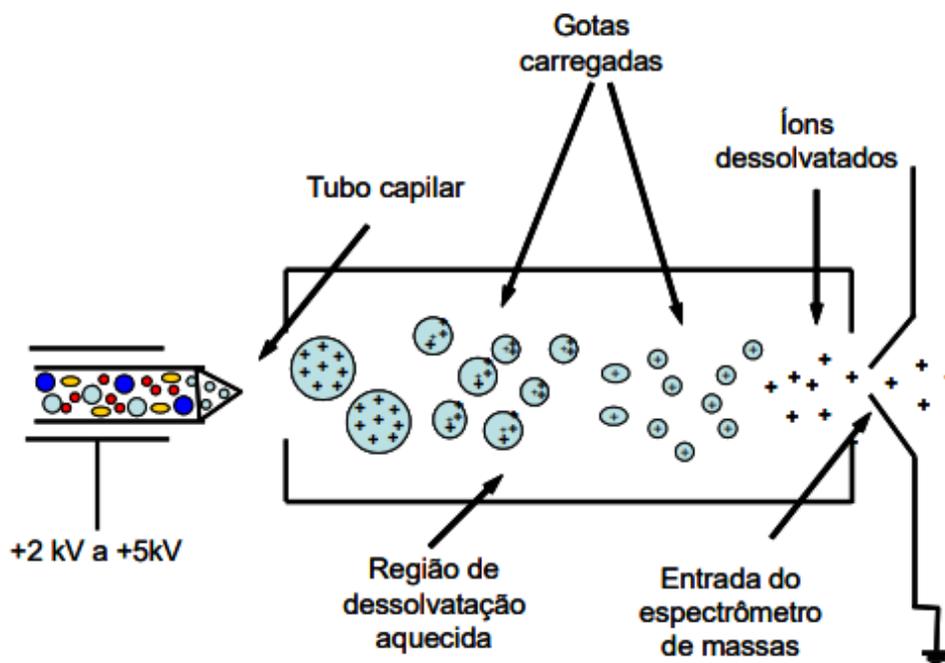
A espectrometria de massas (MS) é uma técnica com ampla utilização e que tem como princípio a ionização de moléculas simples e complexas, separando de forma eficiente os íons tendo como base as razões massa/carga. A princípio um obstáculo encontrado nessa técnica se dá pela dificuldade em misturas complexas, contendo o analito de interesse, de transferir a molécula do analito para sua forma iônica. A espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) aparece no avanço da MS, apresentando como vantagem uma maior resolução e separação da amostra (TOSE, 2018).

As fontes de ionização utilizadas na cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas são: *electrospray ionization* (ESI), que é a ionização por eletronebulização, que não necessita de vácuo para gerar os íons; *MatrixAssisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI), que é a dessorção/ionização de laser, que também não necessita do vácuo para originar os íons; *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI), que é a ionização química por pressão atmosférica; *atmospheric pressure photoionization* (APPI), que é a fotoionização à pressão atmosférica e é a técnica mais recente. Cada uma das fontes de ionização apresenta vantagens e desvantagens, sendo melhor aplicadas de acordo com o tipo da amostra a ser analisada (ABDELNUR, 2011; MÉDICE, 2017).

A fonte de ionização por *electrospray* (ESI), é a técnica melhor aplicada para análise de compostos polares ou iônicos, bem como termolábeis. Nesse método, o eluente vindo da coluna cromatográfica é encaminhado por um tubo capilar metálico que tem um potencial elétrico aplicado. Esse potencial elétrico levará a separação das cargas do solvente. Após a passagem pelo capilar, o eluente será vaporizado, formando gotículas carregadas eletricamente. Então essas gotículas são expostas a um fluxo de nitrogênio para evaporação do solvente. Ao longo da evaporação o tamanho das gotículas vai reduzindo, aumentando a força de repulsão entre as cargas, até o momento em que a tensão superficial é rompida, assim ocorre a dissorção dos íons para a fase gasosa. Na fase gasosa ocorrem as reações químicas, gerando a ionização dos compostos de interesse (ALMEIDA, 2015).

A fonte de ionização por *electrospray* (ESI), representada na figura 8, pode apresentar diversas vantagens dentre elas a possibilidade de analisar compostos iônicos e termicamente instáveis, uma vez que ionização ocorre em fase líquida, bem como o estudo de moléculas com alta massa molecular, devido sua capacidade de produzir íons de múltiplas cargas (PAIVA, 2016). Contudo, essa fonte também apresenta algumas desvantagens, como: não aplicabilidade para compostos com baixa polaridade ou apolares, ocorrência de efeitos causados por interferentes da matriz e a produção de espécies moleculares intactas devido a ionização branda, acarretando na dificuldade de identificação estrutural (ARDREY, 2003).

Figura 8: Esquema da ionização por *electrospray* (ESI).



Fonte: Almeida, 2015.

Além das fontes de ionização, a espectrometria de massas difere também quanto ao tipo de analisador, sendo os tipos mais utilizados: quadrupolos (Q), armadilha de íons (*ion trap* – IT), tempo de voo (*time of flight* – TOF), ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (*Fourier-transformation cyclotron resonance* – FT ICR), *Orbitrap*, além dos analisadores híbridos, como armadilha de íons com tempo de voo (IT TOF) (MÉDICE, 2017).

O *Orbitrap* é um tipo de analisador de massa que tem como funcionamento o aprisionamento dos íons radialmente ao redor de um eletrodo central e por meio da frequência de oscilações iônicas mede os valores de massa/carga. É um equipamento que apresenta alta resolução e precisão de massa, faixa dinâmica aceitável. A desvantagem do *Orbitrap* é ser lento para acoplamento a cromatografias rápidas, a sua velocidade de varredura é inversamente proporcional a resolução de massa (HERNANDEZ et al., 2012).

Outro analisador de massa com ampla utilização é o tempo de voo (TOF), é uma técnica muito utilizada em análise qualitativa, apresenta recursos baseados na aquisição de espectro total de massa precisa e sensível, permite a triagem de grande número de contaminantes com alta sensibilidade em uma execução. Contudo apresenta algumas desvantagens, como ter pouco poder de resolução e/ou

linearidade suficientes. O poder e vantagem do TOF se dá para identificação e confirmação, baseados em precisão de massa e não no poder de resolução (HERNANDEZ et al., 2012).

A espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) foi uma técnica desenvolvida a partir de 1960, que por meio da utilização de componentes como fonte de ionização e analisadores como tempo de voo (TOF) ou *Orbitrap* (OT), permitem uma maior resolução, e dessa forma tem ampla utilização, como em análises de toxicologia ambiental, principalmente quando acoplada a cromatografia líquida (LC). A análise instrumental da técnica hifenada LC-HRMS apresenta diversas vantagens sendo elas: alta seletividade e especificidade, melhor sensibilidade, medição da composição elementar de moléculas ou fragmentos formados durante a ionização, varredura completa, alta precisão de massa, possibilita a identificação do tipo de alteração metabólica e quantifica substratos ou produtos com baixa concentração. Contudo, essa técnica também apresenta algumas desvantagens, como o valor elevado dos aparelhos, insuficiência para algumas aplicações, como ampla triagem e precisa de operadores qualificados, do *software* de avaliação de dados (MAURER et al., 2016; HERNANDEZ et al., 2012).

2. Objetivos

O objetivo geral desta pesquisa foi detectar o agrotóxico carbendazim em água como subsídio para avaliar a toxicidade por meio da exposição crônica.

Os objetivos específicos foram:

- a) Estabelecer protocolo de preparo de amostra que possibilite a detecção do carbendazim em água;
- b) Validar metodologia analítica para detecção de carbendazim na amostra de água ultrapura, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS).

3. Metodologia

3.1 Reagentes e solventes

Os solventes e reagentes utilizados para o preparo das soluções, bem como na etapa de preparo da amostra e validação foram grau HPLC (High performance liquid chromatography), o uso desses solventes e reagentes grau HPLC eliminam interferentes nas análises de HPLC, como baixa sensibilidade e resultados com incompatibilidades. Dentre os reagentes e solventes utilizados, temos:

- Ácido fórmico (EMSURE®);
- Metanol (J. T. Backer®);
- Carbendazim (Sigma-Aldrich®);
- Cartuchos Strata-X-CW (33 µm, polymeric weak cation 30 mg/3 mL) (Phenomenex - California, USA);
- Proxifilina (Sigma-Aldrich®);
- Hidróxido de amônio 28% (CRQ Produtos Químicos®);
- Água ultrapura (Milli-Q®);
- Enzima B-glucuronidase (Sigma-Aldrich®);

3.1.1 Soluções

As soluções estoque de carbendazim e proxifilina (padrão interno) foram preparadas em metanol na concentração de 1 mg/mL. A partir das soluções estoque foram realizadas diluições para preparação das soluções subsequentes: soluções intermediárias de carbendazim nas concentrações de 100 e 50 ug/mL e solução intermediária de proxifilina na concentração de 100 ug/mL.

3.1.1.1 Solução de metanol/ácido fórmico 95:5

Foram preparados 100 mL dessa solução. Foi aliqotado, com o auxílio de uma proveta, 95 mL de metanol, que foram transferidos para o frasco de armazenamento. Em seguida, foram aliqotados 5 mL de ácido fórmico e transferidos para o frasco contendo metanol, o qual foi homogeneizado.

3.1.1.2 Solução de metanol/hidróxido de amônio 95:5

Foram preparados 100 mL dessa solução. Foi aliqotado, com o auxílio de uma proveta, 95 mL de metanol, que foram transferidos para o frasco de armazenamento. Em seguida, foram aliqotados 5 mL de hidróxido de amônio e transferidos para o frasco contendo metanol, o qual foi homogeneizado.

3.1.1.3 Solução de água/metanol 7:3 com 0,1% de ácido fórmico

Foram preparados 10 mL dessa solução. Foi aliqotado, com o auxílio de uma proveta, 7 mL de água milli Q e transferido para o frasco de armazenamento da solução, em seguida, foram aliqotados 3 mL de metanol e transferiu-se para o mesmo frasco. Por fim, foi adicionado 10 µL de ácido fórmico à solução e o frasco foi homogeneizado.

3.1.2 Equipamentos utilizados

- Agitador vórtex;
- SPE Vaccum Manifold;
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) acoplado a um espectrômetro de massas (MS) com fonte de ionização por electrospray (ESI) e analisador tipo orbitrap (Exactive™ Orbitrap mass spectrometer-Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA);
- Banho maria.

3.2 Preparo das amostras

Foi realizado o preparo das amostras coletadas de água milli Q (ultrapura), etapa a qual antecedeu a análise dos resultados do trabalho.

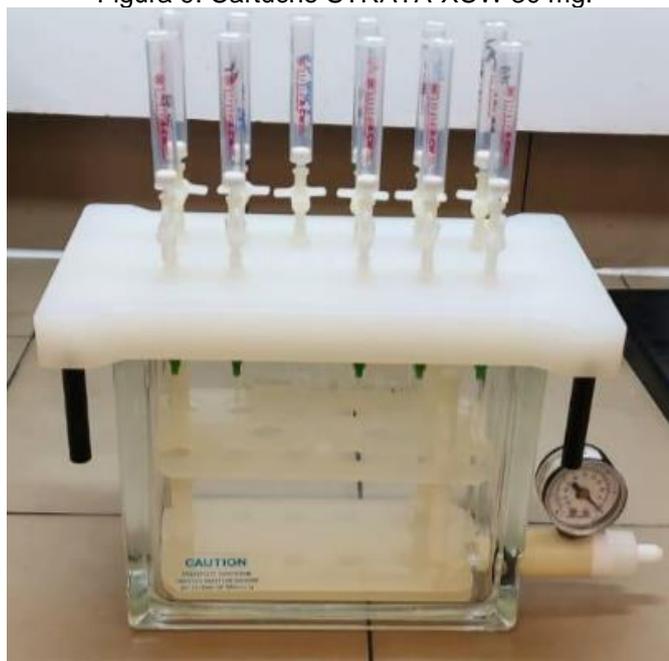
Foram separados tubos de ensaio previamente secos e limpos, nos quais foram armazenadas as amostras de 10 mL de água milli Q. Foi transferido 10 uL de cada amostra para os respectivos vials, os quais foram armazenados em refrigerador a 4 °C. Essa alíquota de 10 uL corresponde à diluição direta da amostra, permitindo a

análise de possíveis metabólitos não extraídos, mimetizando uma situação de análise de amostras complexas.

Em seguida, foram adicionados 10 uL da solução de padrão interno (solução intermediária de proxifilina a 100 ug/mL) e as amostras foram submetidas à hidrólise por meio da adição de 80 uL de enzima β -glucuronidase. Após a homogeneização, os tubos foram levados para o banho a 50°C por 1 hora.

A etapa seguinte foi de extração em fase sólida com cartucho STRATA-XCW 30 mg, ilustrado na figura 9. Essa parte do procedimento foi iniciada com o condicionamento dos cartuchos com 3 mL de metanol, uma vez que o cartucho é de troca iônica e o metanol é o solvente ideal, e uma posterior lavagem com 3 mL de água milli Q. Essas duas lavagens do cartucho não devem levar a secagem completa do mesmo.

Figura 9: Cartucho STRATA-XCW 30 mg.



Fonte: Acervo pessoal da autora.

Foi então aplicada a amostra, auxiliando a eluição com pêra e vácuo. Toda a amostra foi eluída, não permanecendo resíduo no cartucho e na cânula.

Após a completa secagem dos cartuchos, foi aplicado 2 mL da solução de metanol/ácido fórmico 95:5 e 1 mL da solução de metanol/hidróxido de amônio 95:5. O material eluído foi levado para evaporação sob fluxo de nitrogênio.

A etapa de evaporação sob fluxo de nitrogênio, ilustrado na figura 10, gerou um resíduo seco que foi ressuspendido com 60 μL de uma solução de água/metanol 7:3 0,1% de ácido fórmico, seguido da transferência para os vials contendo 10 μL das amostras *in natura*. Os vials foram homogeneizados novamente e todas as bolhas foram retiradas. Foram então armazenados a -20°C até o momento da análise.

Figura 10: Etapa de evaporação sob fluxo de nitrogênio.



Fonte: Acervo pessoal da autora.

3.3 Análise instrumental

As análises instrumentais das amostras de água foram realizadas utilizando-se o cromatógrafo líquido de ultra eficiência, modelo *Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), acoplado ao espectrômetro de massas, a fonte de ionização utilizada foi *electrospray* (ESI) e o analisador foi *Q-orbitrap* do modelo *Q-ExactiveTM Orbitrap* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Foi utilizada a coluna de fase reversa, a *Synchronis-Thermo USA*, com as especificações C18, 1.7 μm , 50 x 2.1 mm, essa coluna é mantida a temperatura de 40°C .

Foram utilizadas duas fases móveis, a fase móvel A é composta por água, 5.0 mM de formiato de amônio e ácido fórmico 0,1% e a fase móvel B por metanol com ácido fórmico 0,1%. Foram aplicadas de acordo com o gradiente de eluição: 0 min, 5% B; 0,2 min, 5% B; 0,5 min, 10% B; 1 min, 25% B; 7 min, 90% B; 11 min, 100% B; 13,1 min, 5% B; 15 min, 5% B. O fluxo da fase móvel foi de 0,3 mL/min, com tempo de corrida igual a 15 minutos, para uma amostra de 5 μL .

A análise foi realizada pelo modo de ionização positivo e modo de aquisição FULL-MS e FULL-MS/data dependente acquisition (DDA)-MS2.

Os parâmetros seguidos foram: voltagem do spray de 2,9 kV; temperatura do capilar de 380°C; radiofrequência da *S-lens* de 80 unidades arbitrárias. Outro parâmetro foram os fluxos de nitrogênio, para o *sheath gas* foi de 60 e para o *auxiliary gas* foi de 20.

Para a aquisição FULL-MS e (DDA)-MS2 foram utilizados parâmetros diferentes, sendo os da aquisição por FULL-MS a resolução de 70,000; *Automatic Gain Control (AGC) target* de 1e6; *Maximun IT* de 100 ms e faixa de massa de 100-1000 *m/z*. Para a (DDA)-MS2 os parâmetros seguidos foram: resolução de 17,500; *Automatic Gain Control (AGC) target* de 1e5; *Maximun IT* de 50 ms; *Isolation Window* de 2,0 *m/z*; *loop count* de 10; *msx count* de 1; Top N de 10, (N) CE de 30 eV e a faixa de massa de 100-1000 *m/z*. A calibração do equipamento foi feita no modo de ionização positivo com a solução produzida pelo fabricante.

3.4 Validação

A validação foi feita para garantir a confiabilidade do método, seguindo os protocolos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017) e do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO, 2016).

O processo de validação das amostras de água foi realizado a partir da separação de tubos de ensaio previamente secos e limpos, para os quais foram transferidos 10 mL de água milli Q alíquotada e as soluções de carbendazim a 50 µg/mL e de proxifilina a 100 µg/mL para a preparação de cada parâmetro avaliado da validação.

Os parâmetros avaliados foram seletividade, curva analítica, repetitividade, precisão intermediária, arraste, robustez e recuperação.

O parâmetro seletividade foi avaliado por meio da análise de 5 amostras sem padrão interno e sem carbendazim, com intuito de verificar a presença de interferentes capazes de prejudicar a detecção/quantificação dos analitos.

A curva analítica ou de calibração determina a linearidade do método, que estabelece a relação entre a concentração do analito e a resposta instrumental. Essa foi realizada com 18 amostras fortificadas com padrão interno a 100 ng/mL e com carbendazim a 5, 50, 150, 300, 500 e 800 ng/mL. Cada ponto da curva foi realizado em triplicata.

A repetitividade é um parâmetro que avalia as medidas obtidas por um mesmo analista, em um mesmo equipamento, durante diversas vezes. Essa análise foi feita usando 7 amostras fortificadas com padrão interno a 100 ng/mL e com carbendazim a 150 ng/mL.

A precisão intermediária tem o processo igual ao da repetitividade, e avalia a reprodutibilidade do método analítico mediante a alteração do analista, o dia da análise ou o laboratório. Neste trabalho, a precisão intermediária foi avaliada por meio da mudança do dia da análise, as amostras foram analisadas no dia seguinte.

O arraste ou *carryover* se deu pela reinjeção da amostra contendo 300 ng/mL de carbendazim entre 2 reinjeções de amostra de seletividade. Esse procedimento foi feito para avaliar a contaminação da amostra pela análise da amostra anterior. Deve ser utilizado no mínimo o dobro da concentração do carbendazim da amostra.

A robustez mede a susceptibilidade de um método diante de pequenas alterações que podem ocorrer e, portanto, é feita alterando alguma característica do processo. Assim, foram ressuspendidas 3 amostras no dia seguinte da extração. Essas 3 amostras foram analisadas e o resultado obtido foi comparado ao resultado de 3 amostras da repetitividade.

A recuperação é determinada pela eficiência da extração, foram utilizadas 7 amostras fortificadas após a extração com padrão interno e carbendazim. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados das amostras da repetitividade.

3.5 Tratamento dos dados

Após a etapa de análise instrumental realizada no cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado ao espectrômetro de massas, foram obtidos dados brutos referentes a cada uma das amostras preparadas para a validação do método. Os dados brutos foram processados utilizando o *software* Thermo Scientific Xcalibur™. A princípio foi realizada a busca das massas exatas do aduto de próton $[M + H]^+$ do carbendazim (m/z 192.0767531) e da proxifilina (m/z 239.1138668), as quais foram calculadas a partir das fórmulas moleculares no Xcalibur. Essas massas exatas foram buscadas em cada uma das amostras e assim alguns sinais cromatográficos, referentes ao carbendazim e à proxifilina foram identificados no modo full-scan, o qual fornece espectros completos, no modo de ionização positivo. Dessa forma foram

calculadas as áreas dos sinais cromatográficos no tempo de retenção do carbendazim e do padrão interno. Essas áreas foram usadas para avaliar os parâmetros da validação.

Após a obtenção de todas as áreas referentes aos sinais cromatográficos do carbendazim e da proxifilina, foram calculadas as razões entre o analito e o padrão interno (PI), bem como a concentração do analito por meio da equação 6.

Equação 6: Concentração do carbendazim.

$$C = \frac{R - Cl}{Ca}$$

Na qual C é a concentração do carbendazim ($\mu\text{g/L}$), R é a razão entre analito/PI, Cl é o coeficiente linear e Ca o coeficiente angular.

Para cada parâmetro foram avaliados os resultados obtidos, por meio de gráfico e equação da reta como no caso da curva analítica ou de equações avaliando o desvio padrão relativo para outros parâmetros.

Outro fator importante no tratamento dos dados foi a conferência da existência de valores aberrantes. Essa análise foi realizada pelo teste de Grubbs. O teste de Grubbs é um teste estatístico que avalia a presença de valores aberrantes, valores que são incompatíveis com o esperado, que diferem das demais replicatas encontradas (INMETRO, 2016). Esse teste é realizado por meio da equação 7:

Equação 7: Cálculo para o G calculado (teste de Grubbs).

$$G \text{ calculado} = \frac{Xi - X \text{ médio}}{S}$$

Onde:

Xi = valor possivelmente aberrante

X médio = valor médio

S = desvio padrão

O resultado do G calculado é comparado com um G tabelado, previamente estabelecido. Dessa forma é avaliada a presença de valores aberrantes, quando o

$G_{\text{calculado}}$ é inferior ao G_{tabelado} o valor não é considerado aberrante, contudo, se o G calculado for maior que o G tabelado esse valor é considerado aberrante e deve ser excluído.

4. Resultados e discussão

4.1 Validação do método analítico

4.1.1 Seletividade

O parâmetro de seletividade avaliou o método quanto a capacidade de detectar o carbendazim na presença de interferentes, garantindo que o sinal cromatográfico presente no tempo de retenção esperado seja referente ao analito de interesse. Esse parâmetro deve ser atendido para que todos os demais parâmetros da validação do método analítico não sejam comprometidos e possam ser devidamente avaliados.

Uma das maneiras de verificar a seletividade do método é avaliar a matriz isenta da substância de interesse. O método é seletivo quando nenhum interferente elui no tempo de retenção esperado para a substância de interesse, a qual também deve estar bem separada dos outros componentes da amostra (RIBANI, et al., 2004), como observado nos cromatogramas obtidos para o parâmetro seletividade.

O método analítico apresenta seletividade para a análise de carbendazim, ao analisar as amostras de água não foi obtido sinal cromatográfico no tempo de retenção do analito de interesse.

4.1.2 Curva analítica

A curva analítica determina a linearidade do método, que estabelece a relação entre a concentração do analito e a resposta instrumental.

A construção da curva analítica foi realizada com 18 amostras fortificadas com padrão interno a 100 ng/mL e com carbendazim a 5, 50, 150, 300, 500 e 800 ng/mL, cada ponto da curva foi realizado em triplicata.

O coeficiente de correção linear (r), ou coeficiente de correlação de Pearson, se refere a um grau de relação entre duas variáveis quantitativas, devendo apresentar valor maior ou igual a 0,99, de acordo com a ANVISA (2003). Dessa forma esse parâmetro se encontra dentro do esperado.

Os testes de Grubbs, que apresentam se há a ocorrência de valores aberrantes, também está dentro do esperado sem nenhum valor aberrante, como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2: Tabela referente ao teste de Grubbs, avaliando a presença de valores aberrantes.

CURVA ANALÍTICA			
Média A/PI	Desvio Padrão A/PI	G calc. (G_{tab.} = 1,155)	Conclusão
2.0172	0.0762	1.008	OK
		0.992	OK
		0.016	OK
1.6245	0.0016	1.051	OK
		0.112	OK
		0.939	OK
3.4189	0.0163	1.003	OK
		0.006	OK
		0.997	OK
6.9704	0.0303	0.856	OK
		1.099	OK
		0.243	OK
11.2177	0.2503	0.819	OK
		1.115	OK
		0.296	OK
18.5311	0.0443	1.132	OK
		0.762	OK
		0.370	OK

Fonte: Elaborado pela autora.

A equação da curva e a curva analítica para as amostras de água são representadas abaixo pela equação 8 e pela figura 11.

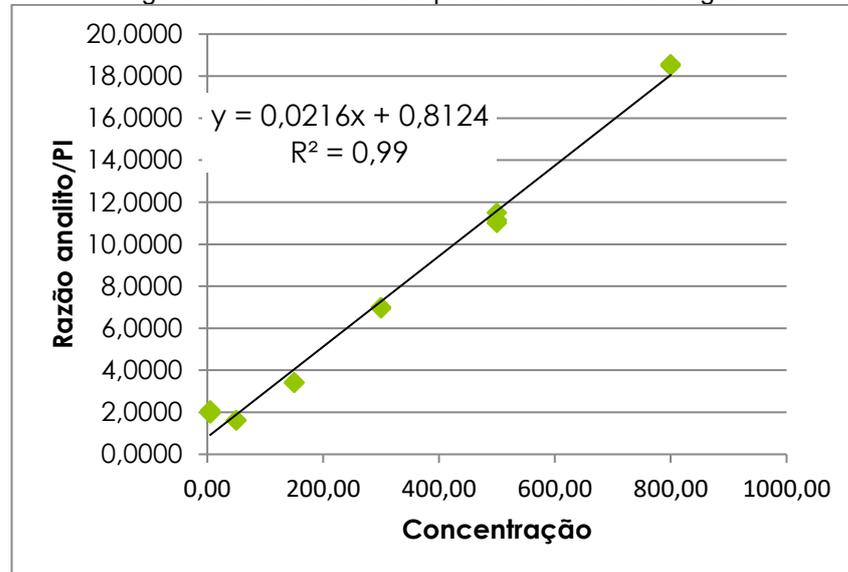
Equação 8: Equação da reta (curva analítica).

$$y = 0,0216 x + 0,8124$$

y = Analito/PI

x = concentração do carbendazim em ng/mL

Figura 11: Curva analítica para as amostras de água.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4.1.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação se refere a menor concentração que o método utilizado permite quantificar com precisão (INMETRO, 2016). Para tanto, a razão sinal ruído (S/N) deve ser maior ou igual a 10 (INMETRO, 2016).

Ao avaliar a concentração inferior da curva analítica, correspondente a 5 ng/mL, é possível determinar a razão sinal/ruído para o carbendazim e para o padrão interno (proxifilina) e ambas são superiores a 10, como exposto na tabela 3. Dessa forma, a concentração de 5 ng/mL é o limite de quantificação de carbendazim para este método analítico. A figura 12 representa o cromatograma para o limite de quantificação.

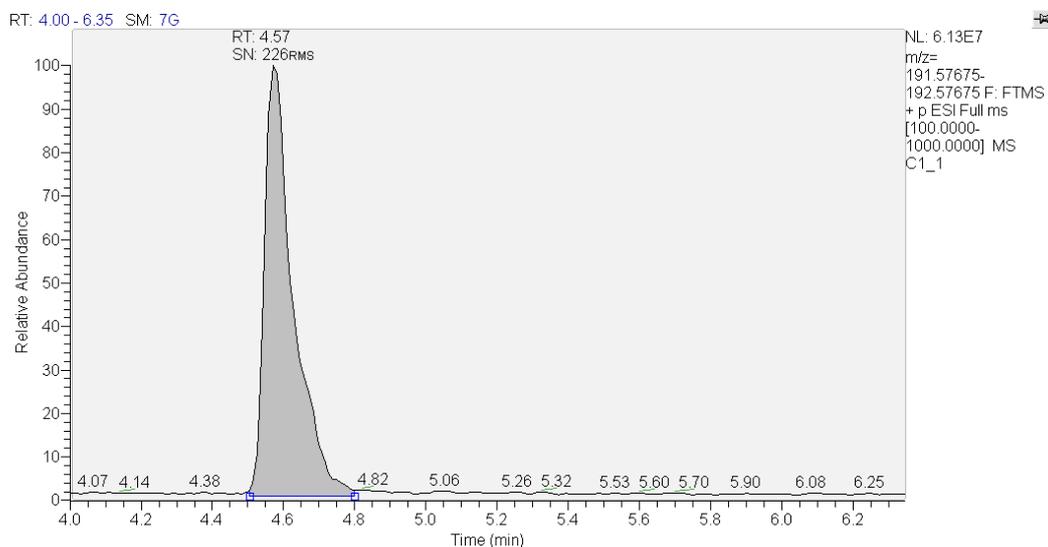
Tabela 3: Relação sinal/ruído para o carbendazim e o padrão interno, na concentração de 5 ng/mL.

SUBSTÂNCIA	RELAÇÃO SINAL/RUÍDO (amostra de água)
Carbendazim	226
Proxifilina	88

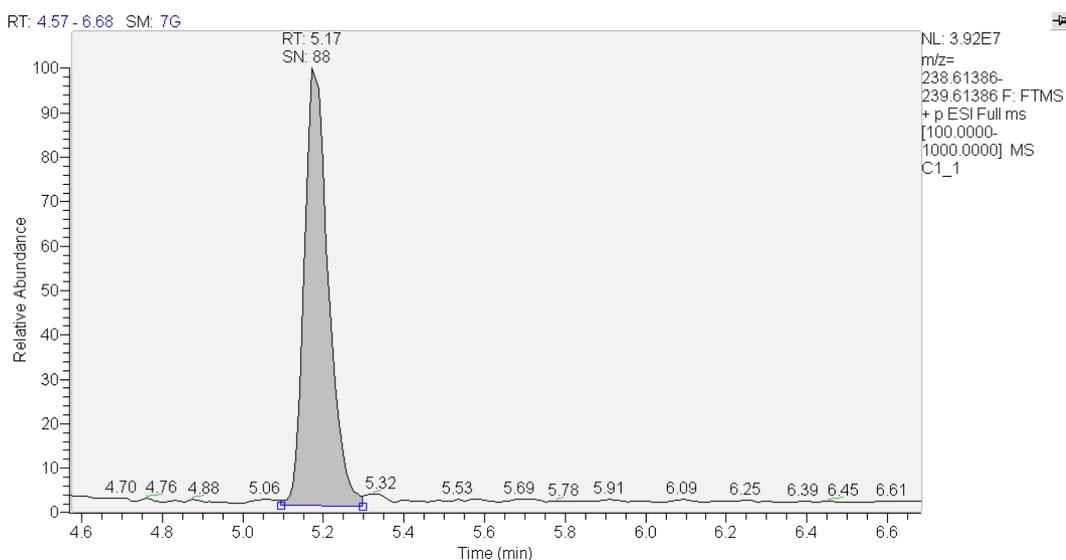
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 12: Cromatograma da menor concentração da curva analítica (5 ng/mL), para o carbendazim (a) e para padrão interno (proxifilina) (b), com as respectivas S/N.

(a)



(b)



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

4.1.4 Repetitividade

A repetitividade ou precisão representa a capacidade do método de gerar resultados similares entre as medições sucessivas, sob as mesmas condições de medição (mesmo procedimento, analista, instrumento, local e repetições em um curto intervalo de tempo) (INMETRO, 2016).

Para avaliar a precisão do método deve-se levar em consideração o coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR), o qual, para esse método, não deve

ultrapassar 15%. Para as amostras de água o valor encontrado de DPR foi de 8,9%, assim, o método pode ser considerado preciso, como demonstrado na tabela 4 (ANVISA, 2003).

Tabela 4: Ensaio da repetitividade para obtenção do coeficiente de variação (CV).

ENSAIO DA REPETITIVIDADE			
	Yi	syij	CV% i recomendado < 20%
CM	3.7679	0.3345	8.9

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

4.1.5 Reprodutibilidade ou Precisão intermediária

A precisão intermediária determina os erros do método analítico decorrentes de alterações realizadas durante o procedimento, tais como analista, dia de análise, equipamentos, local e intervalo de tempo (INMETRO, 2016). No presente trabalho, adotamos a alteração referente ao dia de análise, ou seja, as amostras provenientes da avaliação de repetitividade foram reanalisadas no dia seguinte.

Para atender ao parâmetro de precisão intermediária, as amostras devem apresentar DPR ou CV inferior a 15%.

Os resultados obtidos mostraram DPR igual a 14,0%, como exposto na tabela 5, assim concluiu-se que o método é reprodutível.

Tabela 5: Cálculos dos critérios utilizados na avaliação dos controles de precisão intermediária.

CONTROLES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA			
Concentração	Analito/PI	Concentração Calculada	Resultados
150.00	4.4356	166,595	Desvio de Precisão Intermediária
	4.6614	177.012	
	3.7293	134.017	
	3.6177	128.869	21.062
	3.7644	135.635	
	3.4319	120.301	
	4.0335	148.051	Desvio Padrão Relativo
	4.4356	166.595	
	4.6614	177.012	
	3.7293	134.017	14.0

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

4.1.6 Arraste

O arraste ou *carryover* é um parâmetro para avaliar a contaminação da amostra pela análise da amostra anterior, a fim de garantir a confiabilidade do equipamento. Para esse parâmetro, utiliza-se no mínimo o dobro da concentração do analito da amostra, portanto reinjetou-se a amostra contendo 300 ng/mL de carbendazim entre duas reinjeções de amostras de seletividade, uma vez que a amostra de seletividade é composta somente por água milli Q, portanto caso houvesse a contaminação da amostra depois, apresentaria a presença de carbendazim, indicando o arraste.

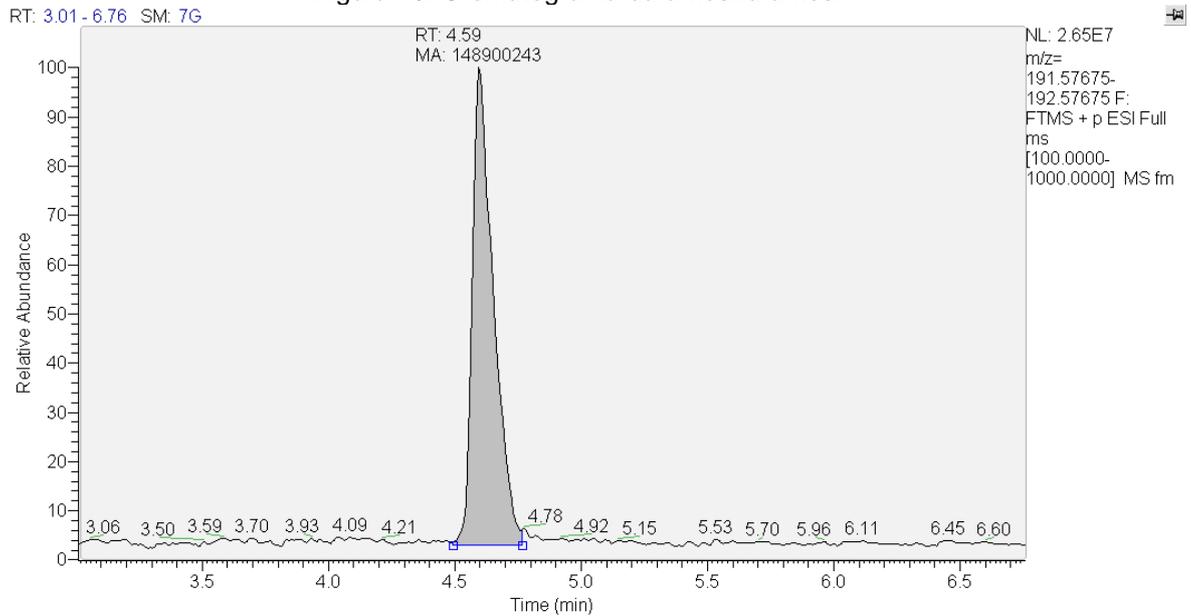
De acordo com a tabela 6 e as figuras 13, 14 e 15 a seguir, é possível observar as áreas que são consideradas na análise do arraste do analito na análise cromatográfica para a matriz água.

Tabela 6: Relação amostra/área para arraste de amostra do carbendazim.

AMOSTRA	ÁREA - AMOSTRA DE ÁGUA
Amostra antes	148900243
Amostra controle (Carbendazim 300 ng/mL)	16118883620
Amostra após	31760727
Resultado	SEM ARRASTE

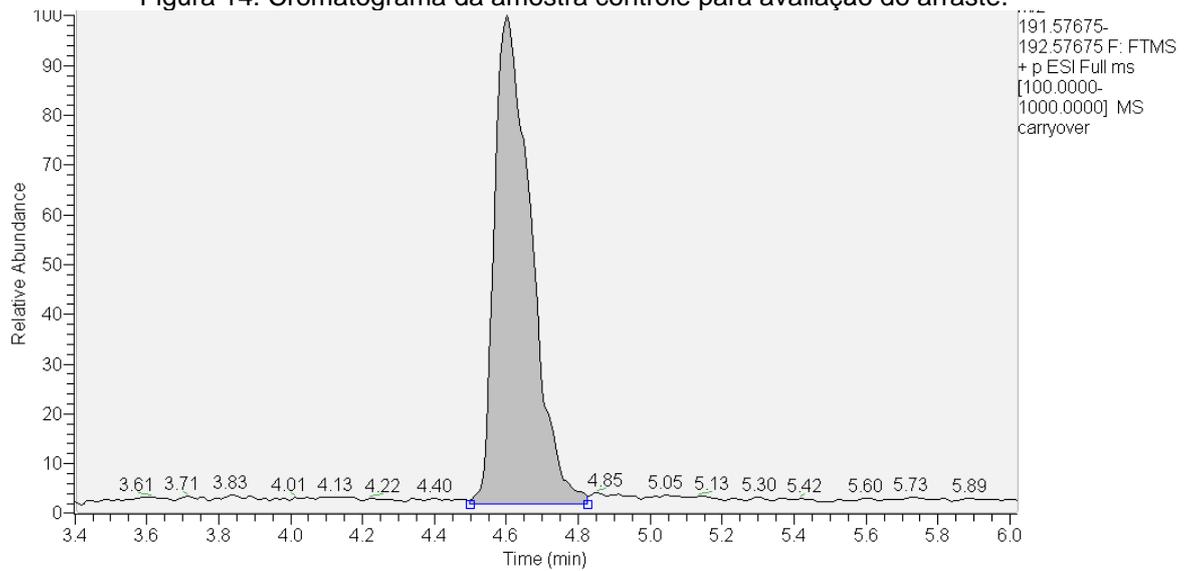
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 13: Cromatograma da amostra antes.



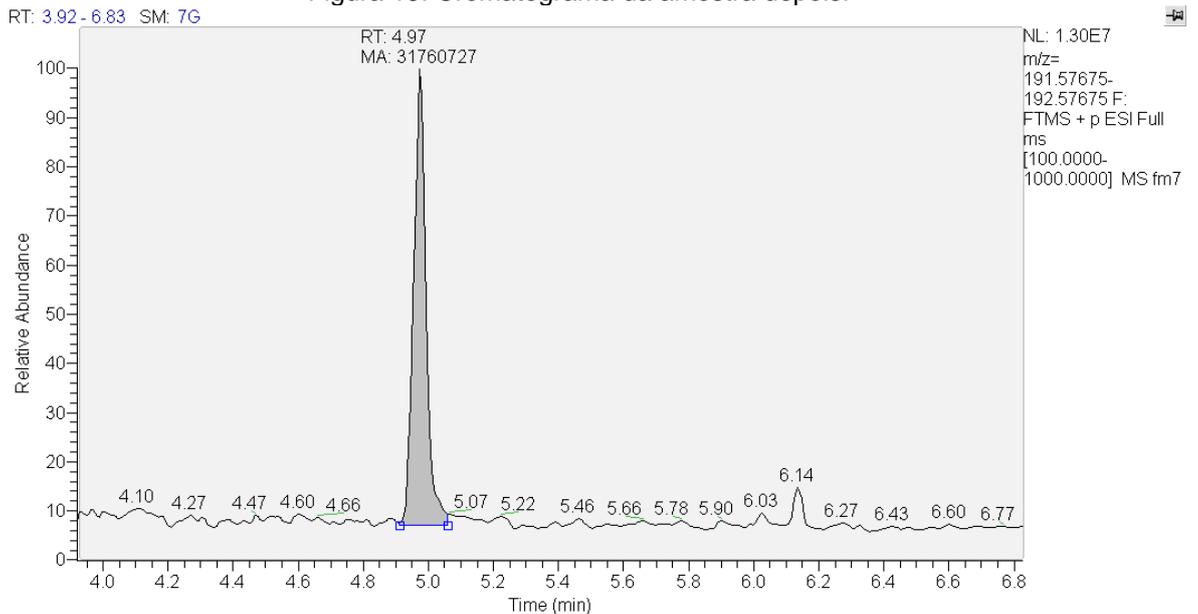
Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Figura 14: Cromatograma da amostra controle para avaliação do arraste.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Figura 15: Cromatograma da amostra depois.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

De acordo com a análise desse parâmetro pode-se considerar que não houve arraste do analito para a amostra seguinte, uma vez que para ser aceito como não ocorrendo o arraste, o sinal na amostra seguinte (amostra depois) deveria ser menor ou igual a 1% do sinal da amostra controle que corresponde ao Carbendazim 300 ng/mL. Assim o sinal da amostra seguinte correspondeu a 0,25% do sinal da amostra controle, estando abaixo de 1% e cumprindo o parâmetro (INMETRO, 2016).

4.1.7 Robustez

A robustez mede a susceptibilidade de um método diante de pequenas alterações que podem ocorrer. Esse parâmetro é avaliado alterando algum procedimento utilizado durante o preparo da amostra ou durante as análises instrumentais. No presente trabalho, optamos por realizar alteração durante o preparo da amostra. Assim, 3 amostras foram extraídas e o resíduo seco correspondente foi ressuspendido no dia seguinte.

Para avaliar que o método analítico seja considerado robusto, o erro relativo entre as amostras analisadas nas condições normais as amostras analisadas com as condições alteradas não podem ser superiores a 10%. O erro relativo obtido foi de 5,69%, assim foi menor que 10%, determinando esse método como robusto (INMETRO, 2016)

4.1.8 Recuperação

A recuperação é um parâmetro determinado pela eficiência da extração e demonstra quanto do analito foi recuperado em comparação com o valor real da amostra (ANVISA, 2003). Tendo seu cálculo expresso pela equação 9 abaixo.

Equação 9: Cálculo da recuperação analítica.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{valor medido}}{\text{valor de referência}} \times 100$$

O esperado para a recuperação é estar entre a faixa de 90 a 110% do valor da concentração nominal.

Foram utilizadas 7 amostras fortificadas após a extração com padrão interno e carbendazim e a recuperação foi de 105,9%. comum DPR de 8,9%. Portanto, a recuperação obtida está dentro da faixa esperada, demonstrando a eficiência do método de extração, representado na tabela 7 (INMETRO, 2016).

Tabela 7: Rendimento de extração, a concentração nominal (%) e desvio padrão relativo.

RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO	
ANALITO	
R.E. CM1 (%)	90.0
R.E. CM2 (%)	94.8
R.E. CM3 (%)	112.2
R.E. CM4 (%)	109.7
R.E. CM5 (%)	111.0
R.E. CM6 (%)	112.3
R.E. CM7 (%)	111.6
MÉDIA	105.9
CV%	8.9

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

5. Conclusão

Para avaliação da confiabilidade do método analítico proposto foi realizada a validação desse método, o qual seguiu os parâmetros recomendados pelo INMETRO e pela ANVISA.

A partir dessa validação foi possível concluir com base nos resultados obtidos, que o método apresenta repetitividade e precisão intermediária adequadas, com coeficiente de variação inferior a 15% e boa seletividade. A curva analítica demonstrou linearidade, uma vez que o coeficiente de correlação obtido foi de 0,99, além disso a partir do teste de Grubbs constatou-se a ausência de valores aberrantes.

O método apresentou um limite de quantificação adequado, o que significa que o método consegue quantificar o carbendazim presente a partir de 5 ng/mL. O método também foi considerado robusto, apresentando erro relativo igual a 5,69%, sendo inferior a 10%.

Não houve arraste (carryover) de uma amostra para outra e a recuperação também foi satisfatória (105.9%).

Assim, o método analítico validado tem grande relevância e importância para avaliação da presença do agrotóxico carbendazim em estudos que envolvam água como matriz.

6. Referências Bibliográficas

ABDELNUR, Patrícia Verardi. Metabolômica e espectrometria de massas. **Embrapa Agroenergia-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Painel de Monografias de Agrotóxicos**. 2021. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias>>. Acesso em: 06 de junho de 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico em Alimentos (PARA). **Dados da coleta e análise de alimentos de 2010, ANVISA. 2013**. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>>. Acesso em: 06 de junho de 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). **Diário Oficial da União**, 2019. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>>. Acesso em: 06 de junho de 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). **Relatório de Atividades de 2009**. 2011. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>>. Acesso em: 06 de junho de 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). **Relatório das análises de amostras monitoras no período de 2017 a 2018**. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>>. Acesso em: 06 de junho de 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). **Relatório das análises de amostras monitoras no período de 2019 a 2020**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>>. Acesso em: 06 de junho de 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução **RDC nº 294**, de 29 de julho de 2019. Dispõe sobre critérios de avaliação e classificação toxicológica, priorização da análise e comparação da ação toxicológica de agrotóxicos, componentes e afins e preservativos de madeira e dá outras providências. Diário Oficial da União, 31 set. 2019b, v. 146, Seção 1, p. 78. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis>. Acesso em: 08 de junho de 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução **RDC nº 295**, de 29 de julho de 2019. Dispõe sobre os critérios para avaliação do risco dietético decorrente da exposição humana a resíduos de agrotóxicos, no âmbito da Anvisa, e dá outras providências. Diário Oficial da União, 31 set. 2019b, v. 146, Seção 1, p. 78. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis>. Acesso em: 08 de junho de 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução **RDC nº 296**, de 29 de julho de 2019. Adota as diretrizes de rotulagem do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, GHS. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 31 jul. 2019a, v. 146, Seção 1, p. 88-89. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis>. Acesso em: 08 de junho de 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução **RDC nº 899**, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2003. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis>. Acesso em: 08 de junho de 2021.

ALMEIDA, Érika Vieira de. **Estudo da degradação de reagentes liofilizados para radiodiagnóstico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massas (MS)**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2015

APVMA (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority). Chemical Review Program. **Human Health Risk Assessment of Carbendazim**, December 2009.

ARDREY, Robert E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**. John Wiley & Sons, 2003.

BABER, N. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH). **British journal of clinical pharmacology**, v. 37, n. 5, p. 401-404, 1994.

BOMBARDI, Larissa Mies. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia**. FFLCH-USP, 2017.

BRASIL. **Lei nº 12873/13**, de 24 de outubro de 2013. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 de outubro de 2013a. Seção 1, p. 1.

BRASIL. **Lei nº 7.802**, de 11 de julho de 1989. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2015.

BRASIL. **Decreto Nº 4.074**, de 4 de janeiro de 2002. Brasília, DF, 2002 [a].

BRASIL. **Decreto nº 8.133**, de 28 de outubro de 2013. Brasília, DF, 2013.

BRASIL. **Portaria de Consolidação Nº 5, de 28 de setembro de 2017**. Consolidação das normas sobre ações e serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. **Portaria GM/MS Nº 888, de 4 maio de 2021**. Ministério de Estado da Saúde, Brasília, DF, 2021

BRITO, Natilene Mesquita et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 2003.

CALDAS, Sergiane Souza et al. Principais técnicas de preparação de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção de arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, pág. 1604-1617, 2011.

CAMPANHOLA, Clayton; BETTIOL, Wagner. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2003.

CARNEIRO, Fernando Ferreira *et al.* **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. EPSJV/Expressão Popular, 2015.

CONLEY, Justin M. et al. Rapid liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of a broad mixture of pharmaceuticals in surface water. **Journal of Chromatography A**, v. 1185, n. 2, p. 206-215, 2008.

COUTINHO, Cláudia FB et al. Carbendazim e o meio ambiente: degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 16, 2006.

DA COSTA, Elizangela Pinheiro. **Degradação de carbendazim em água por foto-Fenton solar em um fotorreator semipiloto do tipo RPR**. 2017.

DIAS, Francielle Regina Silva et al. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos**. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos. 2019.

ELLISON, Stephen LR; BARWICK, Vicki J.; FARRANT, Trevor J. Duguid. **Practical statistics for the analytical scientist: a bench guide**. Royal Society of Chemistry, 2009.

GHINI, R. Resistência de fungos a fungicidas do grupo dos benzimidazóis. **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 1987.

GOTO, Airton et al. **Avaliação da clarificação de subproduto da extração de esteviosídeo por troca iônica**. 2004.

HERNANDEZ, Felix et al. Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 403, n. 5, p. 1251-1264, 2012.

HOLVOET, Katrijn MA; SEUNTJENS, Piet; VANROLLEGHEM, Peter A. Monitoring and modeling pesticide fate in surface waters at the catchment scale. **Ecological modelling**, v. 209, n. 1, p. 53-64, 2007.

IBAMA. **Ranking dos Agrotóxicos**. 2018. Disponível em: <<https://www.gov.br/pt-br>>. Acesso em: 09 de junho de 2021.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. 2016.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA (IPEA). **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória texto para discussão**. Brasília, DF, 76 p. 2019.

INSTRUÇÃO NORMATIVA IBAMA, nº 25, de 1º de setembro de 2009. Disponível em: <www.ibama.gov.br/legis>. Acesso em: 29 de maio de 2021.

IUPAC. **Carbendazim**. 2021. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/116.htm>>. Acesso em 20 de maio de 2021.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

KARLING, Bibiana. ESTUDO DA ADSORÇÃO DO CARBENDAZIM EM BANANA. **ANAIS DO ENIC**, v. 1, n. 3, 2011.

LANÇAS, Fernando M. Et al. **A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”**. Scientia chromatographica, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

MAURER, H. H.; MEYER, Markus R. High-resolution mass spectrometry in toxicology: current status and future perspectives. **Archives of toxicology**, v. 90, n. 9, p. 2161-2172, 2016.

MEDICE, Rhuana Valdetario. **Elucidação estrutural dos subprodutos de cloração do norfloxacino por espectrometria de massas de alta resolução e avaliação de sua toxicidade aguda**. 2017.

MORAIS, Elisa Helena da Costa; BEGNINI, Fernanda Ribeiro; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. **Técnicas de preparo de amostra empregadas na determinação de agrotóxicos carbamatos em água e solo**. 2013.

MUNIZ, Renan de Oliveira. **Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de cortisol em urina de equinos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em tandem, no âmbito do controle de dopagem no esporte**. 2018.

NOVAIS, Augusto S. et al. Novo sorvente de hidrofobicidade reduzida para extração em fase sólida: preparação e caracterização. **Química Nova**, v. 38, p. 274-279, 2015.

PAIVA, R. DE. **Métodos de extração com partição a baixa temperatura para a determinação de marcadores biológicos de exposição ao benzeno, em urina, por UHPLC-MS / MS**. [s.l.] Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP, 2016.

PELAEZ, Victor Manoel et al. A (des) coordenação de políticas para a indústria de agrotóxicos no Brasil. **Revista Brasileira de Inovação**, v. 14, p. 153-178, 2015.

PEREIRA, Andressa Rezende. **Remoção de carbendazim de água por processo de clarificação acoplado à adsorção ou cloração**. 2018.

QUARESMA, A. de V. **Monitoramento de microcontaminantes orgânicos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massa e elementos inorgânicos por fluorescência de raios-X por reflexão total nas águas da Bacia do Rio Doce**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, 2014.

RESOLUÇÃO NORMATIVA CONCEA nº 34, de 27.07.2017 no anexo: **DIRETRIZ DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA**. 2017.

RIBANI, Marcelo et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIGOTTO, Raquel Maria; VASCONCELOS, Dayse Paixão; ROCHA, Mayara Melo. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, p. 1360-1362, 2014.

RODRIGUES, Marili Villa Nova et al. O emprego de técnicas hífenadas no estudo de plantas medicinais. **Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas**, 2006.

SILVA, Renato C.; BARROS, Karina A.; PAVÃO, Antonio C. Carcinogenicidade do carbendazim e seus metabólitos. **Química Nova**, v. 37, n. 8, p. 1329-1334, 2014.

TOSE, Lilian V. et al. Coupling trapped ion mobility spectrometry to mass spectrometry: trapped ion mobility spectrometry–time-of-flight mass spectrometry versus trapped ion mobility spectrometry–Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 32, n. 15, p. 1287-1295, 2018.

US EPA. Validation and Peer Review of U.S. **Environmental Protection Agency Chemical Methods of Analysis**. REVISION: February 3, 2016.

ZAMORA, O. et al. Determination of benzimidazole fungicides in water samples by on-line MISPE–HPLC. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 393, n. 6, p. 1745-1753, 2009.