

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

PÂMELA MENDONÇA GUIMARÃES

IDENTIFICAÇÃO DA HIDRAMETILNONA EM MATRIZES DE
INTERESSE FORENSE

RIO DE JANEIRO

2017

PÂMELA MENDONÇA GUIMARÃES

IDENTIFICAÇÃO DA HIDRAMETILNONA EM MATRIZES DE
INTERESSE FORENSE

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Instituto de Química
da Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de
bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO DA SILVA RIEHL

Rio de Janeiro
2017

PÂMELA MENDONÇA GUIMARÃES

IDENTIFICAÇÃO DA HIDRAMETILNONA EM MATRIZES DE
INTERESSE FORENSE

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Instituto de Química da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do grau de
bacharel em Química.

Aprovada em _____ de _____.

Banca Examinadora

Prof. Carlos Alberto da Silva Riehl – Universidade Federal do Rio de Janeiro
(Presidente)

(Iracema Takase)

(Daniella Lopez Vale)

Rio de Janeiro

2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à UFRJ, pela oportunidade de estudo e crescimento, a bolsa PIBIC e aos meus professores pelos seus ensinamentos de vida e de Química.

Agradeço ao meu professor e orientador Carlos Alberto da Silva Riehl, que me deu a oportunidade de aprender muito além do que a sala de aula, pelos seus conselhos e ensinamentos. Agradeço pela oportunidade de participar do Laboratório de Análises e Metodologias Aplicadas aonde tive a chance de conhecer ótimas pessoas.

Aos meus amigos da faculdade e do laboratório, meu muito obrigada por estarem junto comigo, por seus conselhos e por tantos momentos!

Agradeço muito à Deus, por ter me dado forças para nunca desistir!

Meu muito obrigada ao meu namorado, Gustavo, por sempre estar ao meu lado, me dando apoio, conselhos e críticas. Sem você não teria chegado aonde cheguei!

Ao meu pai, minha mãe, minha irmã, meus avós e toda a minha família, meu muito obrigada por sempre estarem comigo me dando apoio

RESUMO

A Hidrametilnona (HMN) é um inseticida utilizado no combate a formigas e baratas, tanto de uso domiciliar, quanto em áreas agrícolas. A HMN pertence ao grupo dos domissanitários que segundo o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) são os responsáveis por 8,55% de casos de intoxicação humana. Este alto número de casos pode ser explicado pelo fácil acesso dessa substância em estabelecimentos comerciais. O efeito da HMN nos insetos é a inibição da respiração celular da mitocôndria, levando o inseto ao óbito. A HMN pertence à classe da Amidino-hidrazona, apresentando-se como um pó cristalino de cor amarela. O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um método para determinar a hidrametilnona em matrizes de interesse forense em casos de envenenamento intencional. O solvente mais adequado para a realização da extração da HMN foi o acetato de etila, sendo empregado o processo de clean-up, utilizando a alumina para purificação da amostra. Tem-se que a HMN é eluída com o diclorometano e analisada por CLAE-UV. O limite de detecção para HMN foi de 5×10^{-4} mg/ml. O grau de recuperação do método de extração foi realizado com 50,00 g de arroz e fortificada com 2,5 mg de HMN. Após o desenvolvimento e validação do método, este foi utilizado para o processo de contaminação constituído de 200,00 g de alimento com 10,00 g da isca comercial. As análises do material contaminado foram realizadas de 15 em 15 dias, durante 84 dias. No qual se obteve um decaimento ao longo desse período.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da Hidrametilnona.....	10
Figura 2- Fluxograma dos diferentes tipos de cromatografia, adaptado do artigo Cromatografia um breve ensaio, 1998.....	14
Figura 3 - Processo de extração da isca comercial utilizando os solventes diclorometano e acetato de etila.....	18
Figura 4 - Utilização do rotaevaporador para a evaporação do solvente.....	18
Figura 5 - Processo de preenchimento da coluna cromatográfica utilizando como adsorvente a alumina e como solvente o hexano.....	19
Figura 6 - Preparo da pastilha, feita com o extrato, alumina e acetato de etila, para o processo de clean-up.....	19
Figura 7 - Processo de clean-up do extrato da isca comercial. Na sequência, eluição com hexano, diclorometano e acetato de etila.....	20
Figura 8 - Arroz, feijão e frango desfiado utilizados para o processo de contaminação	22
Figura 9 - Armazenamento dos 200g da mistura de alimentos, em cinco frascos hermeticamente fechados. Amostra 1, Amostra 2 e Amostra 3 contendo a isca comercial e Branco 1 e Branco 2 isentos da isca comercial.....	23
Figura 10 - Adição da isca comercial nas amostras 1, 2 e 3.....	23
Figura 11 - Processo de extração das amostras e dos brancos usando-se o acetato de etila como solvente.....	24
Figura 12 - Processo de clean-up dos extratos. Da esquerda para a direita, eluição com Hexano e diclorometano.....	24
Figura 13 - Medida do pH das amostras e dos brancos utilizando-se um pHmetro. .	25
Figura 14 - Cromatograma da HMN extraída da isca comercial, obtida por CLAE-UV, com $t_r = 4,20\text{min}$	27
Figura 15 – Cromatograma do padrão da hidrametilnona com $t_r = 4,30\text{ min}$	27
Figura 16 - Cromatograma referente a solução mãe de concentração 0,5 mg/ml com um pico em 4,2287 min e com absorvância em 898 mAU.....	28
Figura 17 - Cromatograma referente a solução 1 de concentração 0,05 mg/ml com um pico em 4,0553 min e com absorvância em 113 mAU.....	29

Figura 18 - Cromatograma referente a solução 2 de concentração 0,005 mg/ml com um pico em 4,0142 min e com absorvância em 14,3 mAU.....	29
Figura 19 - Cromatograma referente a solução 3 de concentração 0,0005 mg/ml com um pico em 4,0259 min e com absorvância em 3,33 mAU.....	30
Figura 20 - Cromatograma referente a solução 4 de concentração 0,00005 mg/ml com a ausência do sinal.....	30
Figura 21 - Cromatograma referente a curva analítica com concentração 0,05 mg/ml em metanol.....	32
Figura 22 - Cromatograma referente a curva analítica com concentração 0,1 mg/ml em metanol.....	32
Figura 23 - Cromatograma referente a curva analítica com concentração 0,2 mg/ml em metanol.....	33
Figura 24 - Cromatograma referente a curva analítica com concentração 0,3 mg/ml em metanol.....	33
Figura 25 - Cromatograma referente a curva analítica com concentração 0,4 mg/ml em metanol.....	34
Figura 26 - Curva analítica da hidrametilnona obtida da análise por CLAE-UV	37
Figura 27 - Gráfico representando os resíduos obtidos pela diferença entre o y previsto e o y obtido.....	37
Figura 28 - Gráfico referente ao pH das amostras e dos brancos ao longo dos 84 dias.....	41
Figura 29 - Cromatogramas referentes a primeira semana de contaminação. De cima para baixo, Amostra 1 e Amostra 2.....	44
Figura 30 - Cromatograma referente a primeira semana de contaminação, Amostra 3.....	45
Figura 31 - Cromatograma referente a terceira semana de contaminação, Amostra 1.	45
Figura 32 - Cromatogramas referentes a terceira semana de contaminação. De cima para baixo, Amostra 2 e Amostra 3.....	46
Figura 33 - Cromatogramas referentes a quinta semana de contaminação. De cima para baixo, Amostra 1 e Amostra 2.....	47
Figura 34 - Cromatograma referente a quinta semana de contaminação, Amostra 3.	48

Figura 35 - Cromatograma referente a sétima semana de contaminação, Amostra 1.	48
Figura 36 – Cromatogramas referentes a sétima semana de contaminação. De cima para baixo, Amostra 2 e Amostra 3.....	49
Figura 37 - Cromatogramas referentes a nona semana de contaminação. De cima para baixo, Amostra 1 e Amostra 2.....	50
Figura 38 - Cromatograma referente a nona semana de contaminação, Amostra 3.	51
Figura 39 - Cromatograma referente a décima primeira semana de contaminaminação, Amostra 1.....	51
Figura 40 - Cromatogramas referentes a décima primeira semana de contaminação. De cima para baixo, Amostra 2 e Amostra 3.....	52
Figura 41 - Cromatogramas referentes a décima terceira semana de contaminação. De cima para baixo, Amostra 1 e Amostra 2.....	53
Figura 42 - Cromatograma referente a décima terceira semana de contaminação, Amostra 3.....	54
Figura 43 - Gráfico representando as quantidades de extratos obtidos ao longo dos 84 dias.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades Físico-Químicas da Hidrametilnona.....	3
Tabela 2 – Massas finais obtidas das extrações da isca comercial.....	16
Tabela 3 – Concentrações das soluções para a determinação do limite de detecção e suas respectivas absorvâncias.....	19
Tabela 4 – Dados da curva analítica em metanol.....	22
Tabela 5 – Dados e valores obtidos para a determinação do $G_{\text{calculado}}$	26
Tabela 6 – Dados para a determinação do $C_{\text{Calculado}}$	27
Tabela 7 – Resultados de resíduos.....	29
Tabela 8 – Dados obtidos para determinação da % de recuperação.....	30
Tabela 9 – pH das amostras contaminadas e dos brancos ao longo dos 84 dias da contaminação.....	32
Tabela 10 - Dados obtidos pela análise em CLAE-UV para as amostras e a determinação da quantidade de HMN ainda presente nas amostras da 1 ^a à 7 ^a semana.....	33
Tabela 11 – Dados obtidos pela análise em CLAE-UV para as amostras e a determinação da quantidade de HMN ainda presente nas amostras da 9 ^a à 13 ^a semana.....	34
Tabela 12 – Dados das quantidades obtidas de extratos ao longo dos 84 dias.....	46

LISTA DE SIGLAS

HMN	Hidrametilnona
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
RENACIAT	Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	6
3. EXPERIMENTAL:.....	7
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS:.....	7
3.1.1. DETERMINAÇÃO DO SOLVENTE DE EXTRAÇÃO.....	8
3.1.2. PROCESSO DE PURIFICAÇÃO (CLEAN-UP) DO EXTRATO:.....	9
3.1.3. DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO.....	11
3.1.4. CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA.....	12
3.1.5. GRAU DE RECUPERAÇÃO.....	12
3.1.6. CONTAMINAÇÃO DA MATRIZ.....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1. DETERMINAÇÃO DO SOLVENTE DE EXTRAÇÃO.....	16
4.2. PROCESSO DE PURIFICAÇÃO (CLEAN-UP) DO EXTRATO.....	17
4.3. DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO.....	19
4.4. CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA.....	22
4.5. GRAU DE RECUPERAÇÃO.....	30
4.6. CONTAMINAÇÃO DA MATRIZ.....	31
5. CONCLUSÃO.....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

A Química Forense é uma subdivisão da grande área do conhecimento que é a Ciência Forense que tem como princípio a análise, classificação e a determinação de elementos presentes nos materiais encontrados em uma investigação¹. A Química Forense não é aplicada somente a crimes contra a pessoa, mas também na determinação de substâncias adulteradas, no uso de drogas ilícitas, em doping esportivo e perícias em alimentos e medicamentos. Os vestígios coletados pelos peritos, como sangue, veneno, impressão digital, esperma, tinta, fio de cabelo etc, são encaminhados aos Institutos de Criminalística nos quais são analisados por diversos tipos de técnicas, tais como a cromatografia, espectroscopia no ultravioleta e infravermelho, calorimetria, espectrometria de massas e termogravimetria².

O trabalho do laboratório forense pode ser dividido nas seguintes etapas¹:

- 1) Identificação de materiais ou substâncias encontradas como evidência de crime.
- 2) Comparação de substâncias ou materiais na tentativa de se estabelecer uma origem comum.
- 3) Reprodução simulada da cena em que se passou o evento, através da análise física da evidência.

Os materiais suspeitos de serem os agentes causadores do fato criminoso são encaminhados aos Institutos de Criminalística, para que sejam feitos exames químicos com a finalidade de se estabelecer a presença ou não do agente causador do delito¹.

A Perícia Criminal é uma peça importantíssima no processo de investigação, pois fornece o apoio científico à investigação na fase de Inquérito Policial, e a prova material, técnica ou objetiva na fase do Processo Penal, tendo a Química Forense grande importância neste contexto.

A utilização de medicamentos, drogas, inseticidas e agrotóxicos em casos de envenenamento, são os responsáveis por vários casos de homicídios, suicídios e suas tentativas no Brasil ao longo dos últimos anos.

O Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), é um sistema do governo que foi criado em 1980 para que se pudesse ter informações e documentações sobre toxicologia e farmacologia. O SINITOX juntamente com a Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica (RENACIAT), é responsável pela coleta, análise e divulgação de dados sobre casos de intoxicação e envenenamento³.

Segundo o SINITOX em 2013 foram registrados 42.128 casos de intoxicação humana, e os principais agentes tóxicos são os medicamentos com 28,45% seguido de animais peçonhentos com 14,01%, drogas de abuso com 10,29% e os produtos domissanitários com 8,55% dentre outros^{4,5}.

A Hidrametilnona (HMN) (Figura 1) é um inseticida muito utilizado no combate a formigas e baratas, tanto de uso domiciliar, quanto em áreas agrícolas^{6,7}.

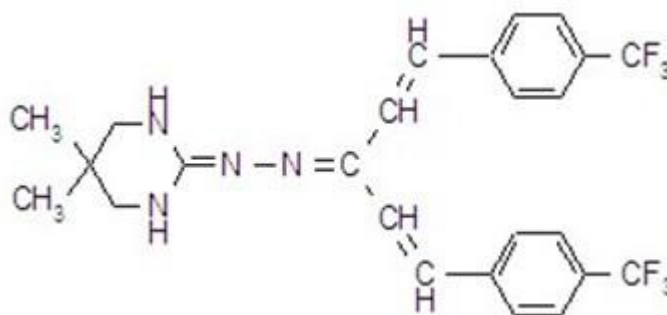


Figura 1 - Estrutura química da Hidrametilnona

Apesar de sua baixa toxicidade (1100–1300 mg/kg em ratos por via oral), e devido ao seu grande e fácil acesso em estabelecimentos comerciais, ela pode ser utilizada em casos de homicídio ou suicídio, pois pertence ao grupo dos domissanitários que são os responsáveis por 8,55% desses casos^{4,5}.

O efeito da hidrametilnona nos insetos é a inibição da respiração celular da mitocôndria, causando a diminuição da atividade física e da respiração, levando o inseto ao óbito^{8,9,10,11}. Devido a ter uma ação lenta, permite que antes do inseto morrer ele seja capaz de chegar até a colônia e transmitir o inseticida para que todos cheguem ao óbito.

A HMN pertence à classe da Amidino-hidrazona, a qual foi descoberta em 1987, que consiste em um pó cristalino de cor característica o amarelo^{7,12,13}. Possui estabilidade a uma temperatura entre 185°C e 190°C e tem baixa solubilidade em

água (de 0,005 a 0,007 ppm à 20°C)^{14,15}.

Na forma de pó seco ela é estável por longos períodos, no entanto, na presença de luz, a HMN se decompõem em quatro principais produtos: ácido p-trifluorometilbenzoico (TFBA), ácido p-trifluorometil-cinâmico (TFCA), 1,5-bis (trifluoro-p-tolil) -l, 4,-pentadien-3-ona (TFP) e 6,7,8,9-tetraidro-7,7-dimetil-3-[p-(trifluorometil) estiril]-4H-pirimido-[2,1-c]-triazin-4-ona (TFPT)⁷. Na tabela 1 encontra-se suas propriedades físico-químicas.

Tabela 1 – Propriedades Físico-Químicas da Hidrametilnona

Massa molecular	494,48 g/mol
Solubilidade	Acetona (360 g/L à 20°C), Etanol (72 g/L à 20°C), Metanol (230 g/L à 20°C), Isopropanol (12 g/L à 20°C), Clorobenzeno (390 g/L à 20°C), Acetato de Etila e Diclorometano.
Solubilidade em água	0,005-0,007 ppm em 20°C
Pressão de vapor	2×10^{-8} mm Hg à 25°C
Meia-vida da fotólise no solo	5 dias (27°C)
Meia-vida de fotólise aquosa	<1 hora (25°C, pH 7,9)
Meia-vida aeróbica	383 dias (25°C)
Meia-vida aquática anaeróbica	455-552 dias
Meia-vida em hidrólise	30 dias (25°C)

Na literatura encontra-se diversos artigos sobre o efeito da HMN em formigas e baratas, e cada artigo trata a respeito de um estudo. Uns descrevem sobre o modo de ação na mitocôndria, a eficiência da isca, fotodegradação da HMN dentre outros.

Vander Meer e seus colaboradores (1982), por exemplo, determinaram os fatores ambientais que influenciariam na decomposição quando a isca é exposta às condições climáticas naturais do verão na Flórida. Os autores colocaram a isca espalhadas em 3 bandejas de 40 x 52cm e colocaram estas em uma área desobstruída ao ar livre. Três amostras da isca foram coletadas de cada bandeja depois de 12, 24, 36, 48, 60, 72 e 144 h para ser analisado a toxicidade. As amostras obtidas nos mesmos intervalos de tempo foram analisadas por cromatografia gás-líquido, utilizando cloreto de metileno como solvente. A detecção foi realizada por ionização de chama. Outro teste foi realizado utilizando 3 bandejas contendo a isca sendo colocadas em um forno à 52°C com ausência de luz. As amostras coletadas foram com 0, 48, 96 e 144 h, sendo feito o mesmo tipo de análise que a anterior. Chegou-se à conclusão de que a decomposição da HMN ocorre durante a luz do dia, e que é estável sob altas temperaturas, 52°C¹³.

Um outro exemplo, é do estudo de Subhasish Chakraborty e seus colaboradores (1993) sobre a função do pH na fotodecomposição da hidrametilnona em um sistema aquoso sob luz solar. Para investigar tal efeito, 100mg/L de substrato foi preparado em tampão de fosfato com valores de pH de 4,8, 6,5 e 8,0. A solução foi colocada num balão cônico e depois irradiada sob a luz solar. A amostra foi extraída com acetato de etila, e o extrato orgânico foi seco com sulfato de sódio anidro e em seguida colocado em um rotaevaporador a 45°C. Os resultados que eles obtiveram mostraram que após 10h de irradiação, a recuperação da hidrametilnona foi de 11,28%, 9,43%, e 6,32% com pH de 4,8, 6,5, e 8,0 respectivamente e que nenhuma degradação significativa ocorreu no escuro em qualquer pH⁶.

Contudo, não foi encontrado nenhum estudo da HMN voltada para a investigação criminal envolvendo envenenamento de uma matriz de alimento. Com isso, o presente estudo se fez necessário para que em possíveis casos de envenenamento essa substância fosse determinada.

Diversas técnicas podem ser utilizadas para a determinação e caracterização da HMN, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência, a cromatografia em camada delgada e a cromatografia líquida à pressão atmosférica. Na figura 2 se encontra um fluxograma para os tipos de cromatografia existentes.

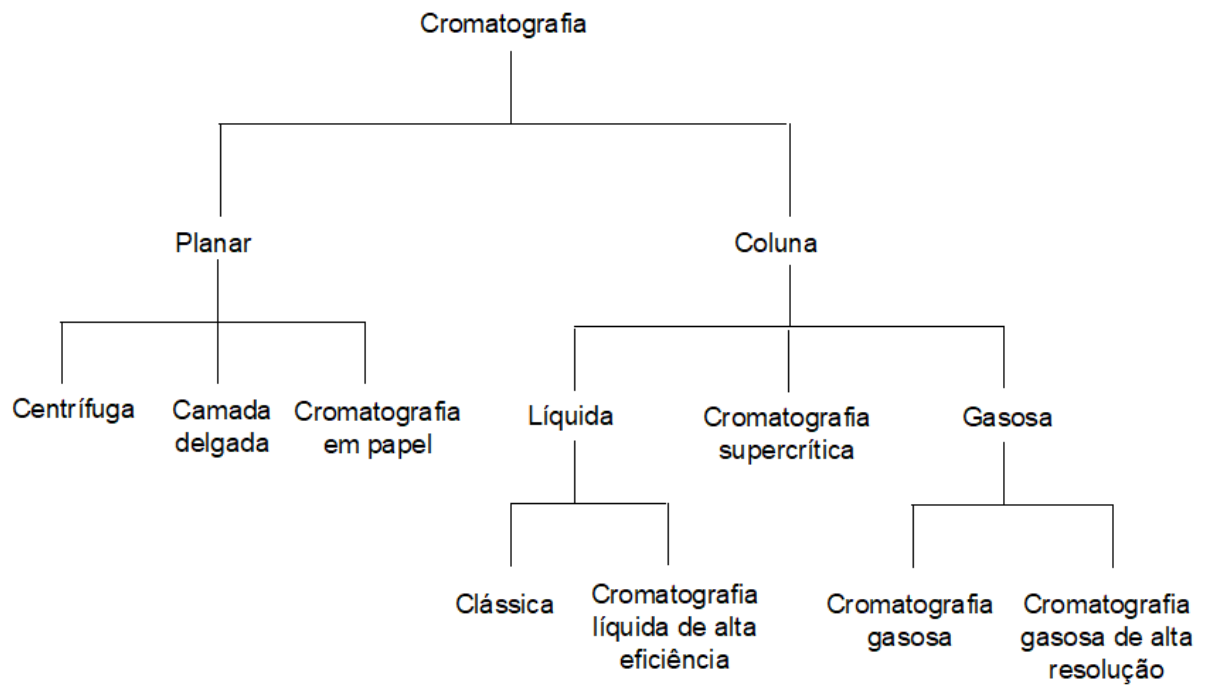


Figura 2- Fluxograma dos diferentes tipos de cromatografia, adaptado do artigo Cromatografia um breve ensaio, 1998.

2. OBJETIVO

O estudo tem como objetivo a determinação e caracterização da hidrametilnona em matrizes de interesse forense e para que os Institutos de Criminalísticas em todo o território Nacional, em especial o Instituto de Criminalística Carlos Éboli no Estado do Rio de Janeiro, possam utilizá-lo, sendo um método rápido e capaz de identificar esta substância nas evidências coletadas das cenas de crime. A matriz utilizada consiste de uma mistura de alimentos sendo eles, arroz, feijão e frango desfiado, contaminados com uma isca comercial

3. EXPERIMENTAL:

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS:

O padrão de referência da hidrametilnona foi adquirido pela *Sigma-Aldrich*, com pureza de 98%.

Para a contaminação das matrizes, utilizou-se um inseticida comercial de 10,00 g, que contém 2% m/m de hidrametilnona como princípio ativo. Este produto é encontrado em lojas de produtos de animais.

A matriz utilizada para a contaminação consistiu de uma mistura de 350g de arroz, 350g de feijão e 300g de frango desfiado, cozidos e adequados para o consumo.

Os reagentes e solventes utilizados para análise grau P.A. foram: acetato de etila (Quimex), diclorometano (Tedia), hexano-95% (Tedia), metanol (Merck) e sulfato de sódio anidro (Quimex).

Foram utilizados os seguintes solventes grau CLAE: metanol (Merck) e ácido fosfórico (Merck).

As medidas de pH foram realizadas em um aparelho 827 pH Lab da Metrom, com eletrodo de vidro.

A balança utilizada para pesar as massas foi a balança analítica de modelo CP224S da Sartorius.

O pipetador multiplette plus *Eppendorf* e a ponteira de 2,5 ml foram utilizados para a retirada de alíquotas para as devidas diluições.

A evaporação dos solventes foi feita usando um rotaevaporador de modelo 802 da Fisatom.

Para o processo de clean-up usa-se uma coluna de vidro de 1,0 cm de diâmetro e 17 cm de altura. A coluna foi recheada com Alumina, Al_2O_3 , da Aldrich Chemical Company, Inc. com partículas 150 mesh.

O cromatógrafo utilizado para a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi o Varian ProStar de modelo 410, com detector UV da Varian de modelo Prostar 325 ($\lambda=228\text{nm}$). Utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 com 4,6mm x 150mm e 5 μm , utilizando-se como solvente A o metanol e como solvente B solução de ácido fosfórico 0,1% em uma proporção 90%A:10%B, em modo isocrático com fluxo de 0,5mL/min, com um volume de injeção de 10,00 μl e com tempo de análise cromatográfica de 10 min. Otimização desse método a partir do método fornecido pela *Sigma-Aldrich*.

O estudo foi dividido em 6 etapas que são:

- 3.1.1 Determinação do solvente de extração;
- 3.1.2 Processo de purificação (clean-up) do extrato;
- 3.1.3 Determinação do Limite de Detecção;
- 3.1.4 Construção da Curva analítica;
- 3.1.5 Grau de Recuperação;
- 3.1.6 Contaminação da matriz.

3.1.1. DETERMINAÇÃO DO SOLVENTE DE EXTRAÇÃO

Utilizou-se uma isca comercial contendo 9,00 g com 2% m/m de HMN. O método foi realizado sendo testado dois solventes, o diclorometano e o acetato de etila. A isca foi então colocada em um bécher onde foi adicionado o solvente sendo feito 5 x 20,00 ml, totalizando 100,00 ml, e feita cada extração por aproximadamente 3 min (Figura 3). A solução que se obtém foi então transferida para um balão que foi colocado em um rotaevaporador, para a evaporação do solvente (Figura 4). O

extrato obtido foi dissolvido no solvente utilizado e armazenado em um frasco de vidro.



Figura 3 - Processo de extração da isca comercial utilizando os solventes diclorometano e acetato de etila.

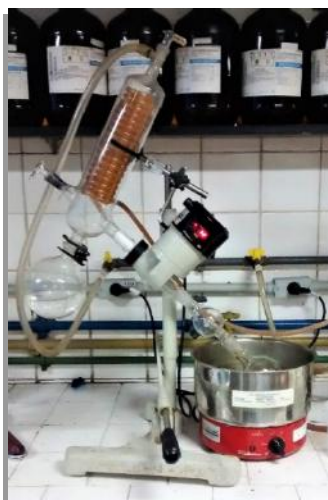


Figura 4 - Utilização do rotaevaporador para a evaporação do solvente.

3.1.2 PROCESSO DE PURIFICAÇÃO (CLEAN-UP) DO EXTRATO:

O procedimento foi realizado utilizando-se uma coluna de vidro sendo testado dois tipos de adsorventes, o florisil e a alumina. O adsorvente foi transferido para a coluna até uma altura aproximada de 6,5 cm usando como solvente o hexano

(Figura 5). O extrato utilizado foi obtido a partir da extração de uma isca comercial. Para a transferência do extrato para a coluna, foi feita uma pastilha consistindo de: extrato, adsorvente (florisil ou alumina) e acetato de etila. Esta foi então transferida para a coluna (Figura 6). As eluições foram realizadas com 50,00 ml de hexano, seguido de 50,00 ml de diclorometano e terminado com 80,00 ml de acetato de etila (Figura 7). A fração recolhida com o diclorometano foi transferida para um balão e colocada em um rotaevaporador para a evaporação do solvente. O extrato então foi solubilizado com metanol e transferido para um vial de 2,0 ml e analisado por CLAE.

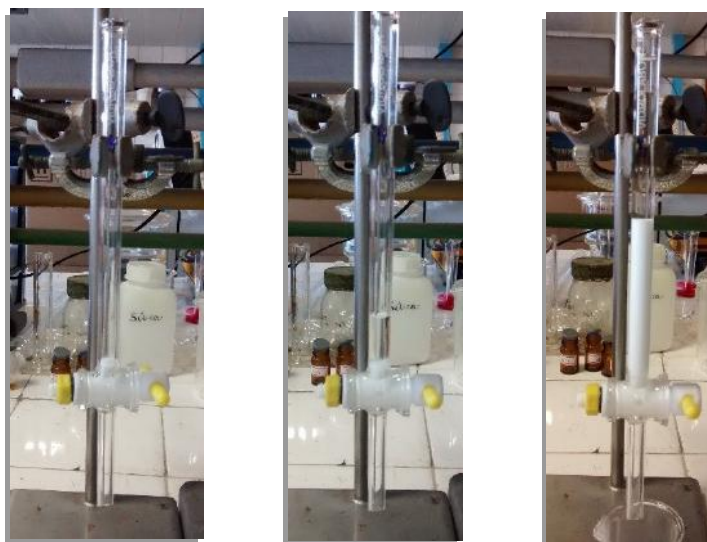


Figura 5 - Processo de preenchimento da coluna cromatográfica utilizando como adsorvente a alumina e como solvente o hexano.



Figura 6 - Preparo da pastilha, feita com o extrato, alumina e acetato de etila, para o processo de clean-up.

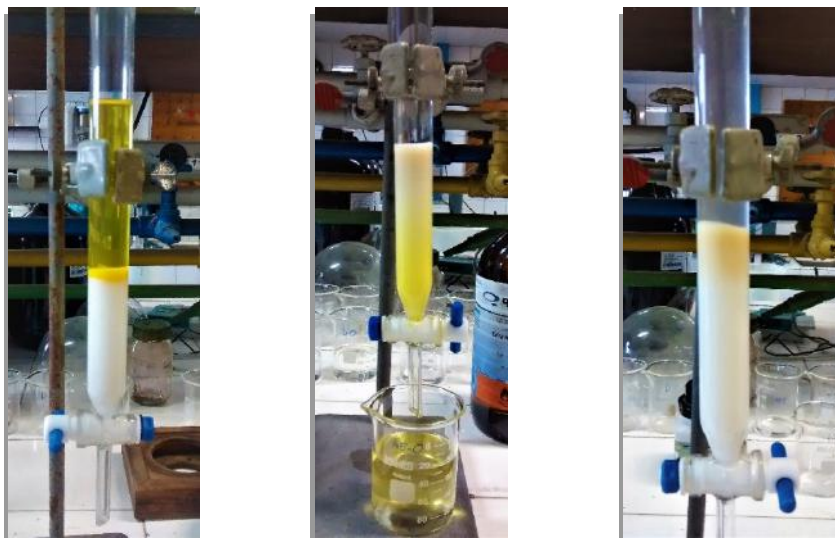


Figura 7 - Processo de clean-up do extrato da isca comercial. Na sequência, eluição com hexano, diclorometano e acetato de etila.

3.1.3 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO

Para o limite de detecção o procedimento foi realizado utilizando um balão volumétrico de 10,00 ml para o preparado da solução mãe contendo 5,00 mg do padrão utilizando como solvente o metanol. Em seguida foram preparadas 4 soluções em balões volumétricos de 10,00 ml em que para cada nova solução foi retirado da solução anterior 1,00 ml. Ou seja, para o preparo da solução 1 se retirou 1,00 ml da solução mãe, para o preparo da solução 2 se retirou 1,00 ml da solução 1, assim sucessivamente até a solução 4. Com as soluções prontas foi retirado de cada um 1,00 ml e colocado em vials e analisadas por CLAE.

3.1.4 CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA

Prepara-se em um balão volumétrico de 10,00 ml uma solução mãe contendo 2 mg do padrão utilizando o metanol como solvente. A partir desta então fez-se 5 soluções com concentrações diferentes e conhecidas, utilizando um balão

volumétrico de 10,00 ml. A partir da solução mãe retirou-se alíquotas de 0,25 ml; 0,50 ml; 1,00 ml; 1,50 ml e 2,00 ml para se ter as concentrações de 0,050 mg/ml, 0,10 mg/ml, 0,20 mg/ml, 0,30 mg/ml e 0,40 mg/ml respectivamente.

3.1.5 GRAU DE RECUPERAÇÃO

Em um bécher foi colocado 50,0880 g de arroz e 2,6 mg de HMN e feita a homogeneização por 30 min. Retira-se aproximadamente 5,00 g desta mistura e feito o processo de extração, por 5min, utilizando como solvente o acetato de etila sendo usado 3x10,00 ml, totalizando 30,00 ml. A solução obtida foi seca com sulfato de sódio anidro e o sobrenadante foi transferido para um balão que é então colocado em um rotaevaporador para a evaporação do solvente. Esse processo foi feito em triplicata. Em seguida foi realizado o processo de clean-up como descrito no item 3.1.2 (pág. 9). Após obter os extratos com a eluição do diclorometano, estes são dissolvidos em 1,00 ml de metanol sendo colocados em vial e levados para análise por CLAE.

3.1.6 CONTAMINAÇÃO DA MATRIZ

Com todas as análises anteriores realizadas se inicia o processo de contaminação de uma amostra com uma isca comercial. Para essa etapa utilizou-se uma mistura de 1,00 kg de alimento, sendo composta de aproximadamente 350,00 g de feijão e arroz e 300,00 g de frango (Figura 8).

Dessa mistura de 1,00 kg de alimentos, foi retirado aproximadamente 200,00 g e colocados em 5 potes diferentes. As amostras foram feitas em triplicata com a adição de 10,00 g da isca comercial (Amostra 1, Amostra 2, Amostra 3) e os brancos feitos em duplicatas isentos da isca comercial (Branco 1 e Branco 2) (Figura 9) e (Figura 10). Os potes eram hermeticamente fechados e armazenados à temperatura ambiente. A homogeneização então das amostras foi feita por 30 min.

O processo de extração das amostras e dos brancos foi como descrito no item 3.1.5 (pág. 12), sendo que foi retirado de cada triplicada da amostra e de cada duplicata do branco aproximadamente 1,50 g. O volume de acetato de etila utilizado foi de 3x5,00 ml, totalizando 15,00 ml (Figura 11).

O procedimento de clean-up foi como descrito no item 3.1.2 (pág. 9), sendo que para as eluições foi usado 15,00 ml de hexano e 20,00 ml de diclorometano (Figura 12).

Todo esse processo, desde da contaminação até o clean-up, foi feito no primeiro dia. A partir da segunda semana, somente foi feito algumas etapas. A primeira coisa a ser feita foi a visualização do aspecto físico dos alimentos, tanto das amostras quanto dos brancos, e então feito a homogeneização por 5min. Em seguida foi feita a medida do pH (Figura 13) e depois então os processos de extração e clean-up.

As análises foram feitas de 15 em 15 dias, totalizando um período de 84 dias, com o procedimento sendo o mesmo para as amostras contendo as iscas comerciais e para os brancos isentos das iscas.



Figura 8 - Arroz, feijão e frango desfiado utilizados para o processo de contaminação



Figura 9 - Armazenamento dos 200g da mistura de alimentos, em cinco frascos hermeticamente fechados. Amostra 1, Amostra 2 e Amostra 3 contendo a isca comercial e Branco 1 e Branco 2 isentos da isca comercial.



Figura 10 - Adição da isca comercial nas amostras 1, 2 e 3.

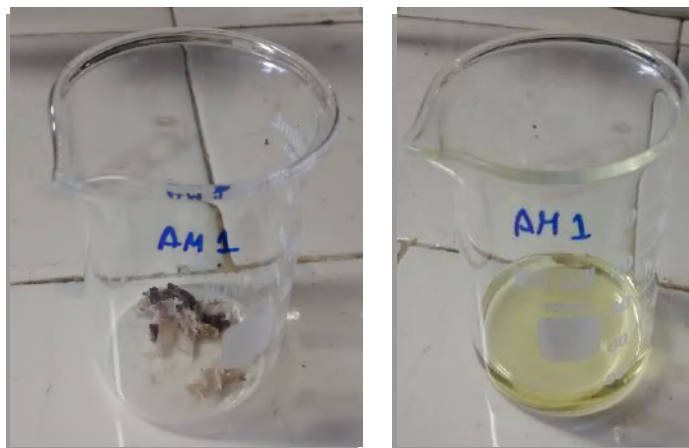


Figura 11 - Processo de extração das amostras e dos brancos usando-se o acetato de etila como solvente.

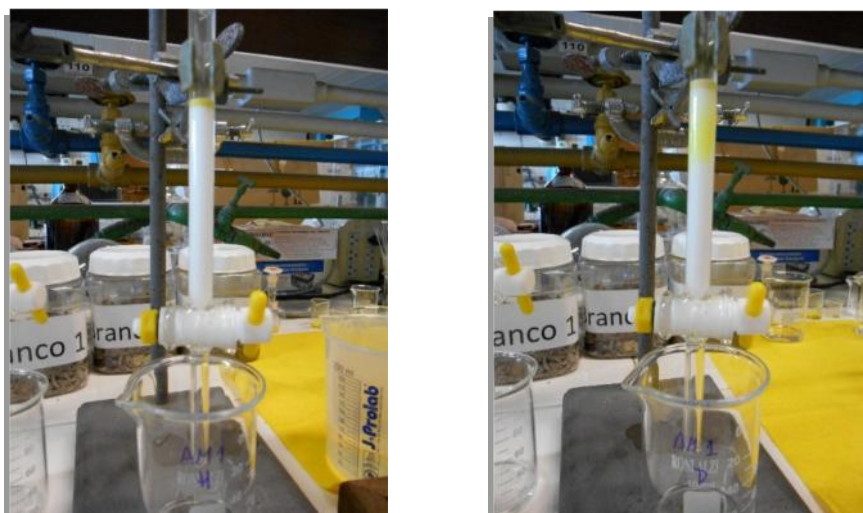


Figura 12 - Processo de clean-up dos extratos. Da esquerda para a direita, eluição com Hexano e diclorometano



Figura 13 - Medida do pH das amostras e dos brancos utilizando-se um pHmetro, com um eletrodo de vidro.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DO SOLVENTE DE EXTRAÇÃO

O extrato final obtido foi armazenado em um frasco de vidro e foi pesado em uma balança analítica, sendo feito tanto para o extrato com diclorometano quanto para o acetato de etila. Na Tabela 2 encontra-se as massas finais obtidas. Essas massas finais foram obtidas a partir da pesagem dos balões antes e depois da rotaevaporação.

Tabela 2 – Massas finais obtidas das extrações da isca comercial

Diclorometano	1,24 g
Acetato de etila	1,33g

Infelizmente não foi feito o processo de clean-up após a extração, com isso não se pode garantir que as massas que foram obtidas são somente de HMN extraída. Contudo, pode ser visto que o poder de extração do acetato de etila foi um pouco melhor do que com o diclorometano e por isso ele foi o escolhido como o solvente mais adequado para ser feita a extração da HMN de uma isca comercial. Porém é necessário que seja refeito essa etapa concluindo com o processo de clean-up.

4.2 PROCESSO DE PURIFICAÇÃO (CLEAN-UP) DO EXTRATO

Para o empacotamento da coluna foi testado primeiro com florisil, sendo que quando era feito a eluição com o diclorometano, a amostra ficava dispersa pela coluna fazendo com que a eficiência da separação e a resolução do cromatograma ficassem ruins. Com isso, se passou a utilizar a alumina pois foi visto que com a eluição com o diclorometano, a amostra era eluída uniformemente obtendo então um melhor resultado.

O hexano foi escolhido como o primeiro solvente utilizado no processo de clean-up devido ele ser o que melhor retira toda a gordura e ácido graxo presente na matriz, deixando somente a amostra na coluna. Os resultados para este processo

mostraram que com a eluição do hexano, visualmente, têm-se uma solução transparente. Com a eluição do diclorometano foi observado a formação de uma camada amarela abaixo da pastilha, sendo obtida uma solução amarela. Com a eluição do acetato de etila foi obtido uma solução também transparente. A utilização do acetato de etila como um último solvente, foi para garantir que toda a amostra tinha eluído com o diclorometano.

Como visualmente obtive uma solução amarela na eluição do diclorometano, esta solução foi levada para análise em CLAE para poder ter a confirmação. Esta foi feita a partir do pico presente que é característico da HMN e da comparação com o tempo de retenção do padrão.

Na Figura 14 o cromatograma obtido pelo equipamento para o extrato possui um pico com um $t_r = 4,20$ min, e na Figura 15 o cromatograma do padrão que tem o $t_r = 4,30$ min. Ao comparar os cromatogramas e os tempos de retenções foi possível confirmar a presença da hidrametilnona no extrato obtido.

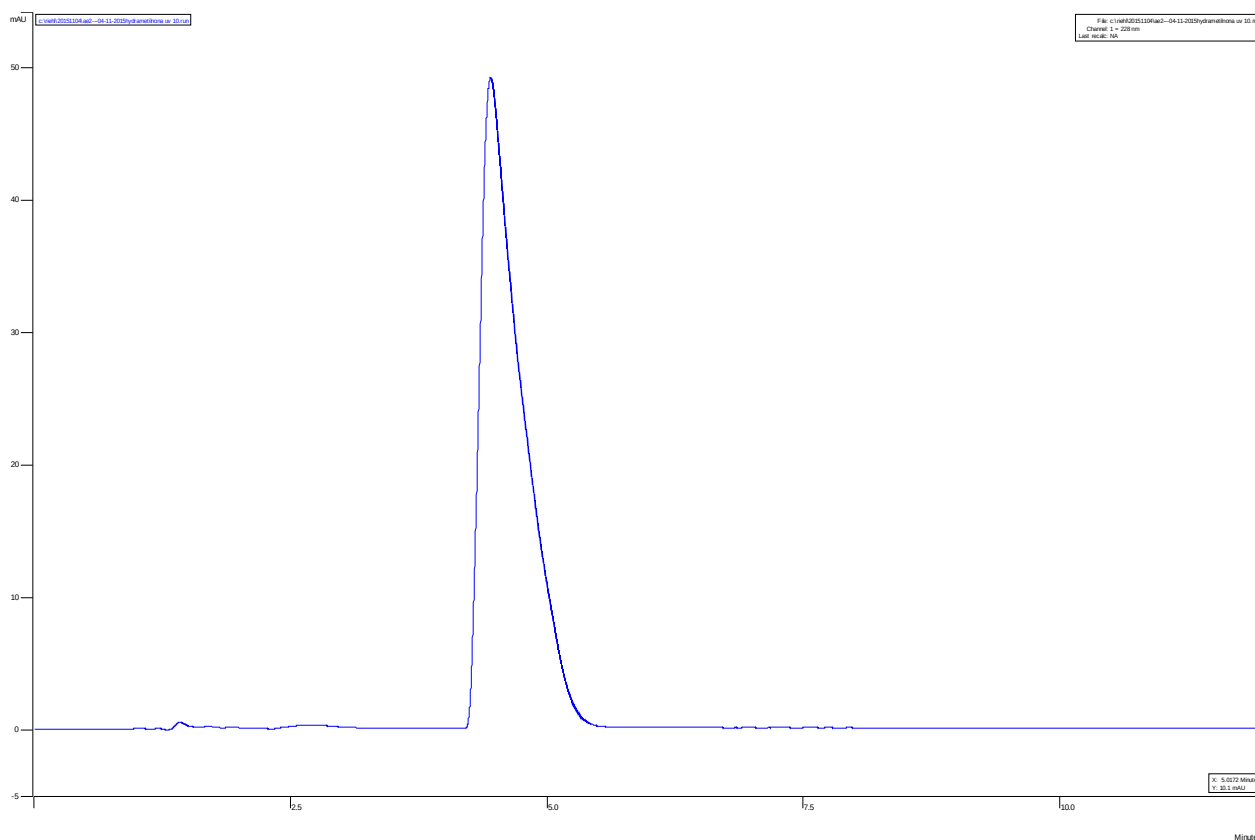


Figura 14 - Cromatograma da HMN extraída da isca comercial, obtida por CLAE-UV, com $t_r = 4,20$ min

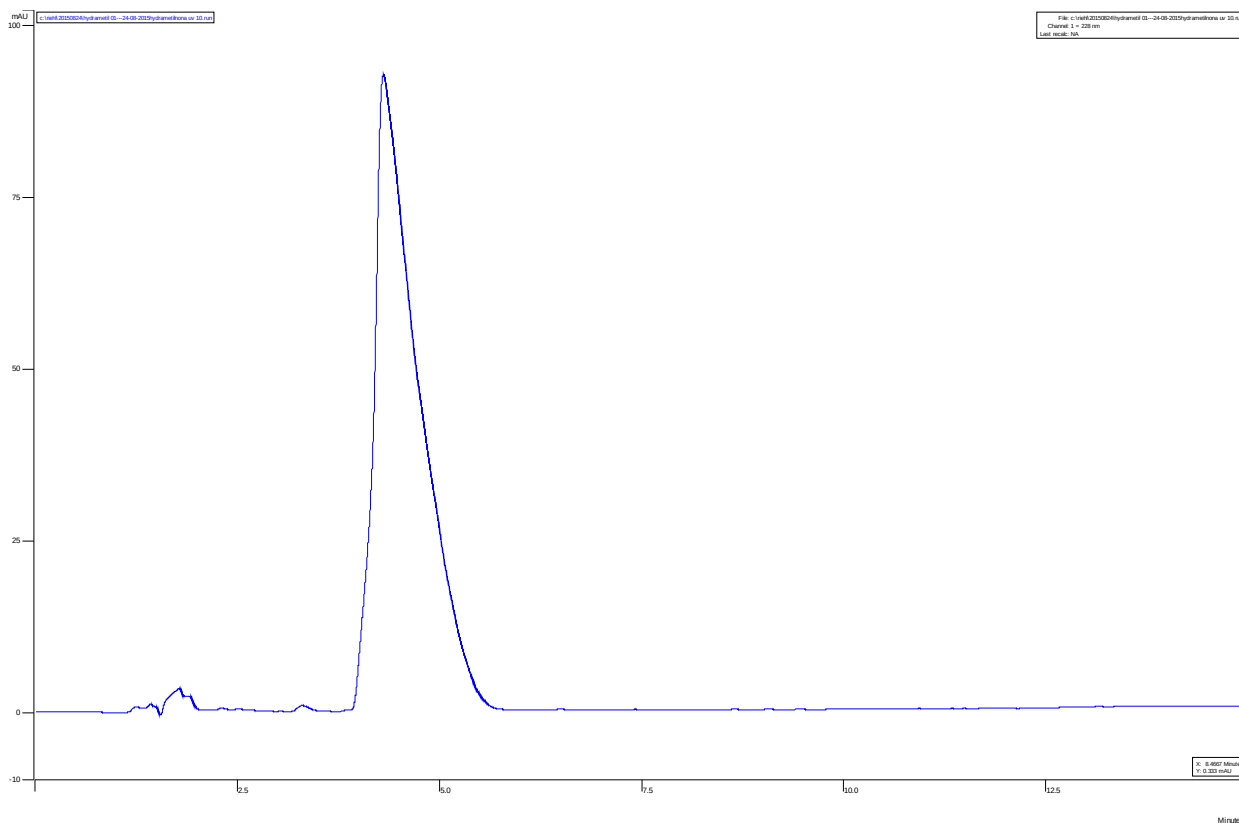


Figura 15 – Cromatograma do padrão da hidrametilnona com $t_r = 4,30$ min.

4.3. DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO

Na Tabela 3 encontra-se as concentrações e os dados obtidos pelo equipamento e nas Figuras 16, 17, 18, 19 e 20 os cromatogramas referentes a cada solução.

Tabela 3 – Concentrações das soluções para a determinação do limite de detecção e suas respectivas absorvâncias.

	Concentração (mg/ml)	Tempo (min)	Absorvância (mAU)
Solução mãe	0,5	4,2287	898
Solução 1	0,05	4,0553	113
Solução 2	0,005	4,0142	14,3
Solução 3	0,0005	4,0259	3,33
Solução 4	0,00005	-	-

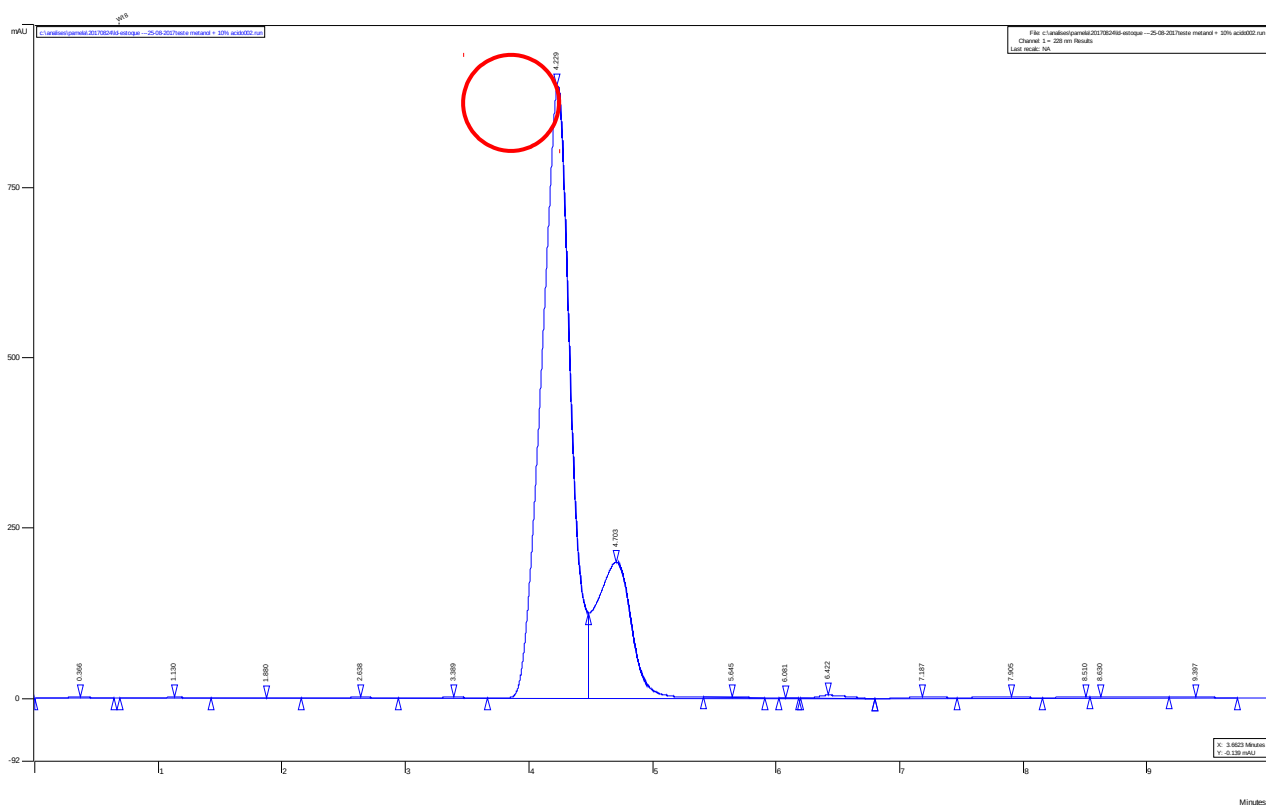


Figura 16 - Cromatograma referente a solução mãe de concentração 0,5 mg/ml com um pico em 4,2287 min e com absorvância em 898 mAU.

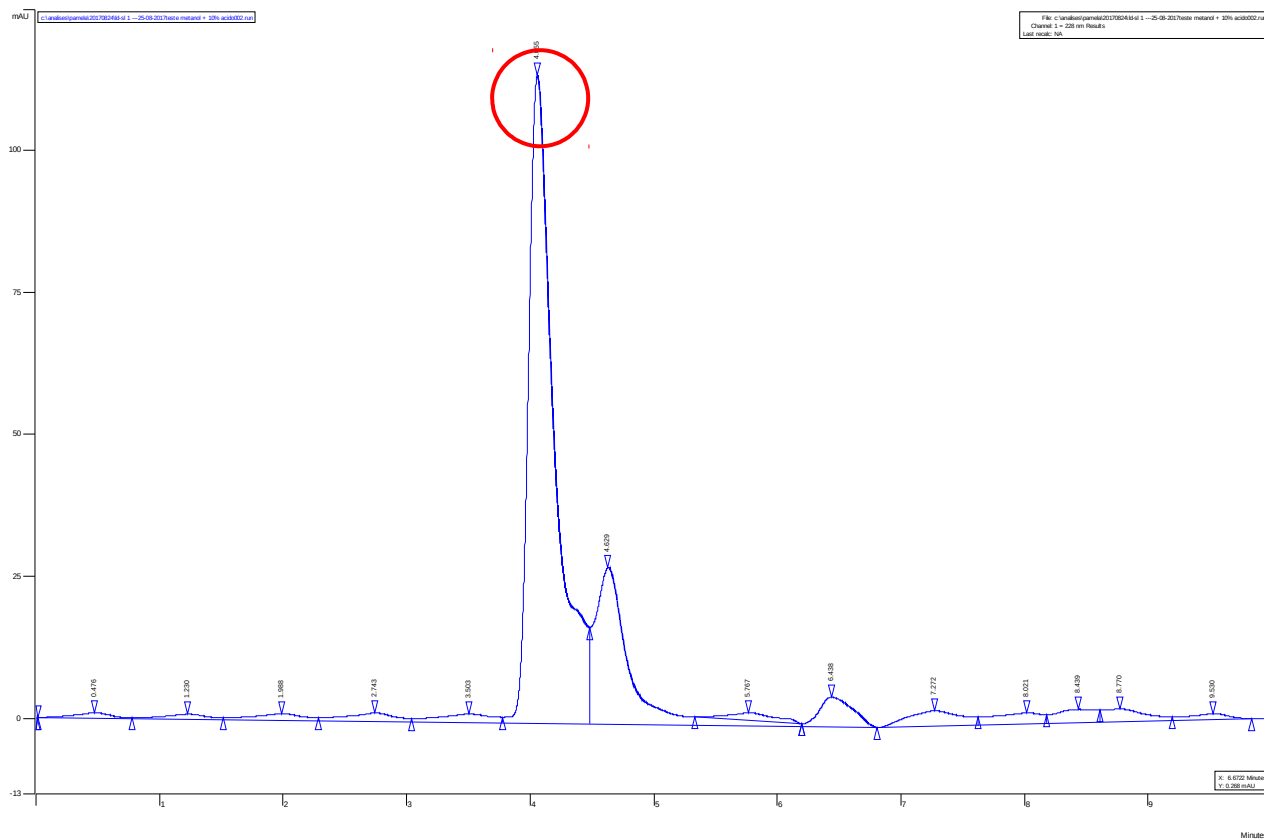


Figura 17 - Cromatograma referente a solução 1 de concentração 0,05 mg/ml com um pico em 4,0553 min e com absorvância em 113 mAU.

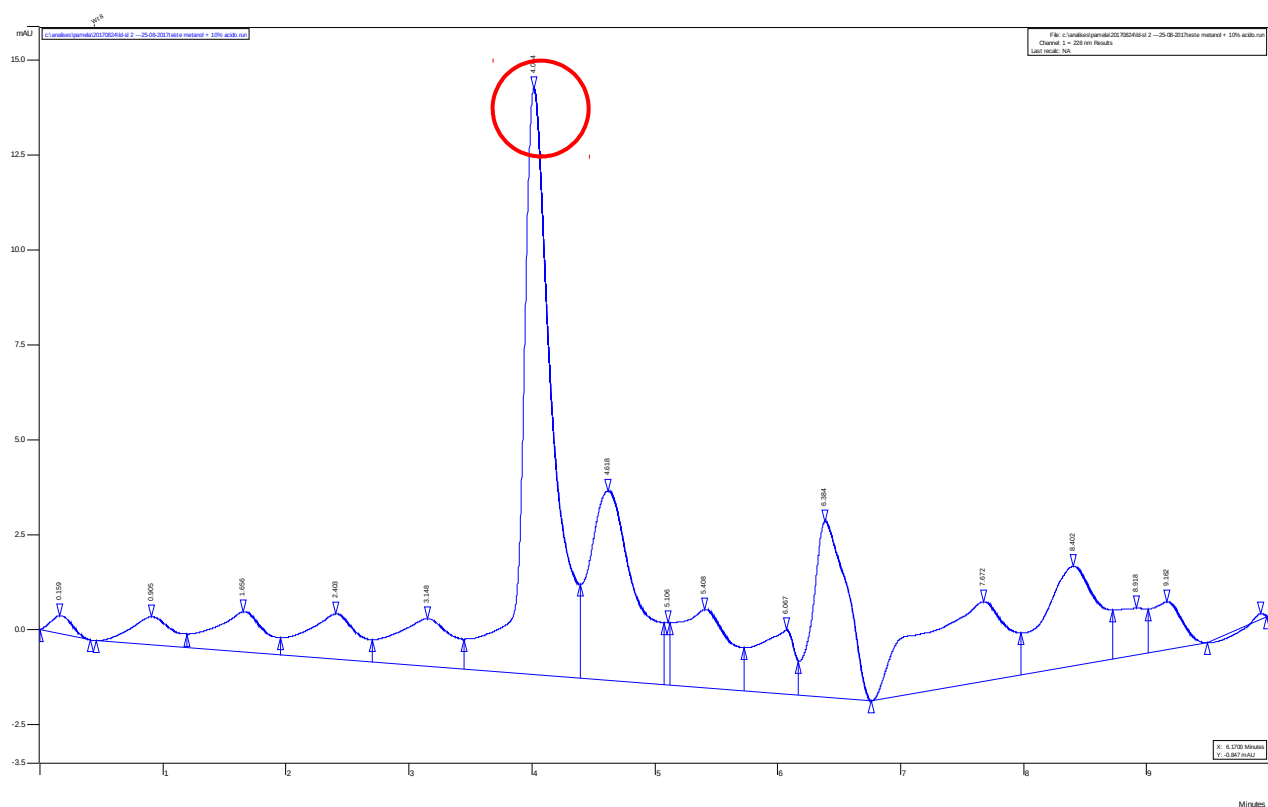


Figura 18 - Cromatograma referente a solução 2 de concentração 0,005 mg/ml com um pico em 4,0142 min e com absorvância em 14,3 mAU.

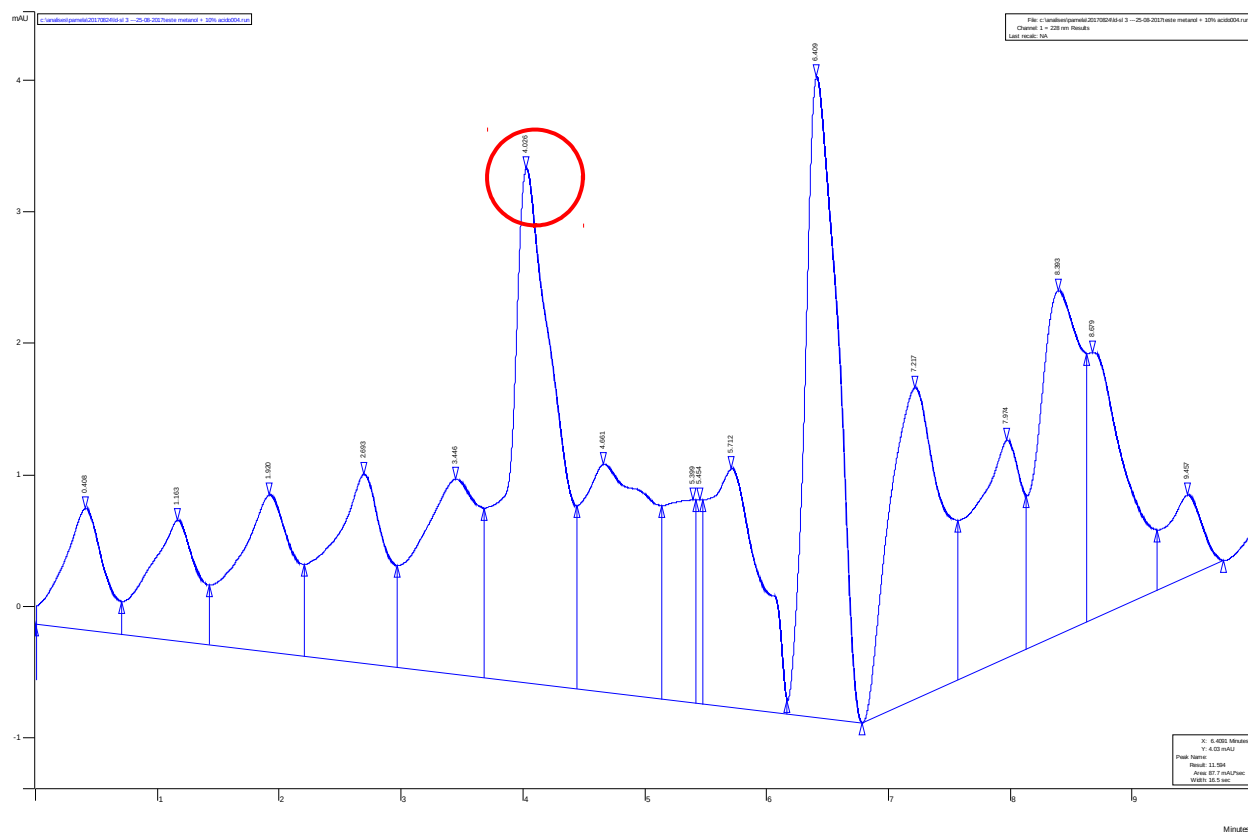


Figura 19 - Cromatograma referente a solução 3 de concentração 0,0005 mg/ml com um pico em 4,0259 min e com absorvância em 3,33 mAU.

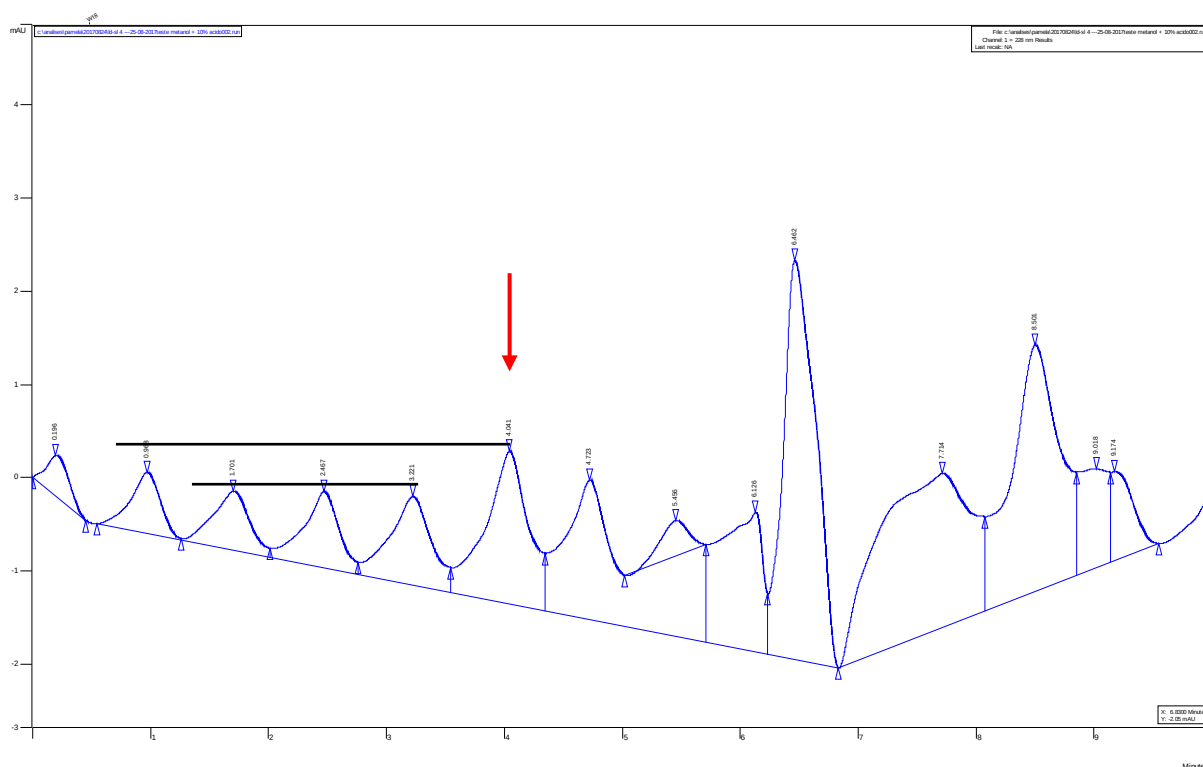


Figura 20 - Cromatograma referente a solução 4 de concentração 0,00005 mg/ml com a ausência do sinal.

Na Figura 20, o máximo em que se consegue ver o pico característico da HMN é com uma concentração de 5×10^{-4} mg/ml (Figura 19). Pois quando tem a concentração de 5×10^{-5} mg/ml, na Figura 20, a relação sinal-ruído não é 3x maior, ou seja, este não é considerado como um sinal. Com isso o limite de detecção para a HMN é de 5×10^{-4} mg/ml, sendo a análise feita por CLAE-UV e utilizando o metanol como solvente.

4.4. CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA

Na tabela 4 encontra-se os resultados obtidos por CLAE para a curva analítica em metanol com as respectivas concentrações. Os cromatogramas obtidos para cada concentração se encontra nas Figuras 21, 22, 23, 24 e 25.

Tabela 4 – Dados da curva analítica em metanol

Amostra	Concentração (mg/ml)	Tempo (min)	Absorvância (mAU)	Área (mAU*sec)
CM 1	0,050	3,01	151	2020
		3,00	151	2017
		3,01	149	2034
CM 2	0,10	3,05	250	3873
		3,03	265	3874
		3,03	269	3846
CM 3	0,20	3,04	534	7849
		3,04	541	7877
		3,03	538	7885
CM 4	0,30	3,04	839	11779
		3,05	819	11669
		3,05	820	11673
CM 5	0,40	3,06	1080	15300
		3,058	1100	15700
		3,07	1160	16200

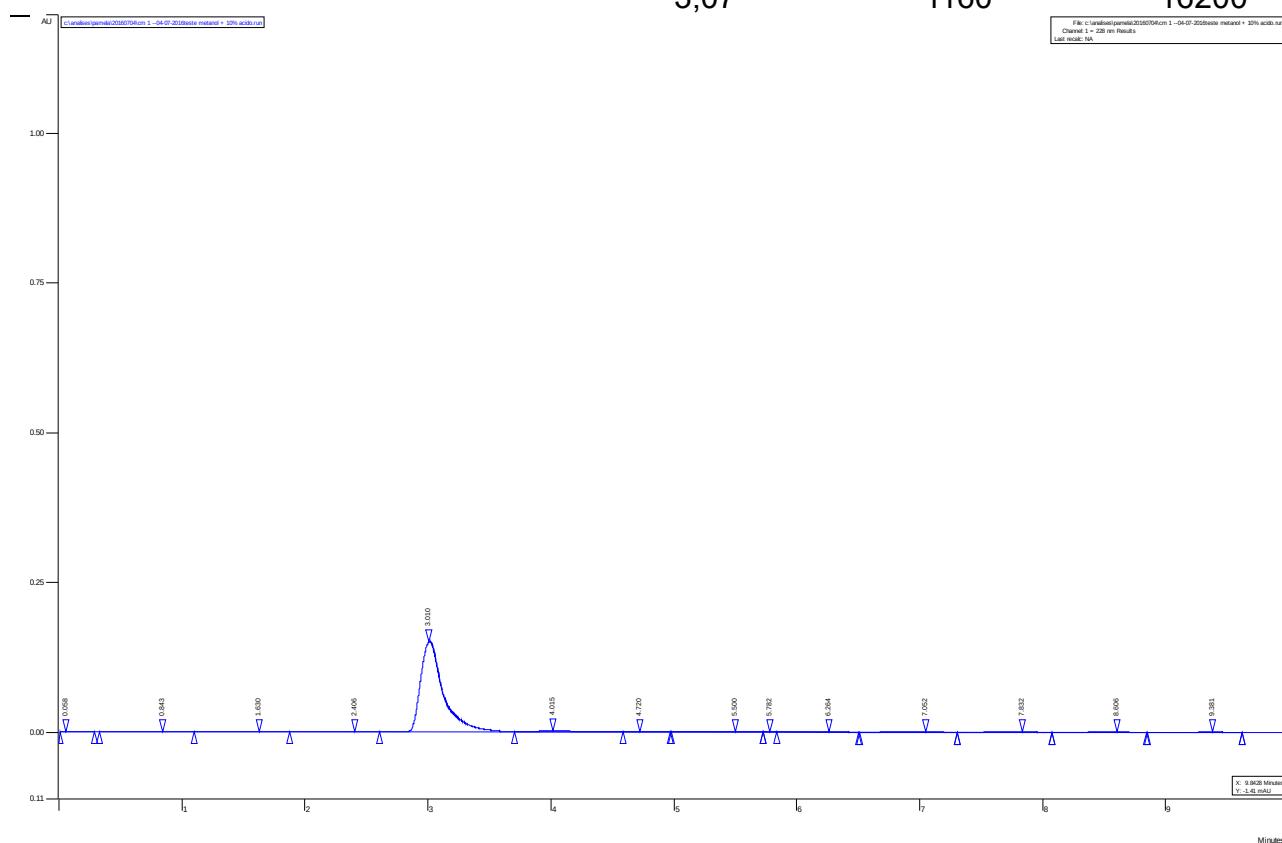


Figura 21 - Cromatograma referente a curva analítica com concentração 0,05 mg/ml em metanol

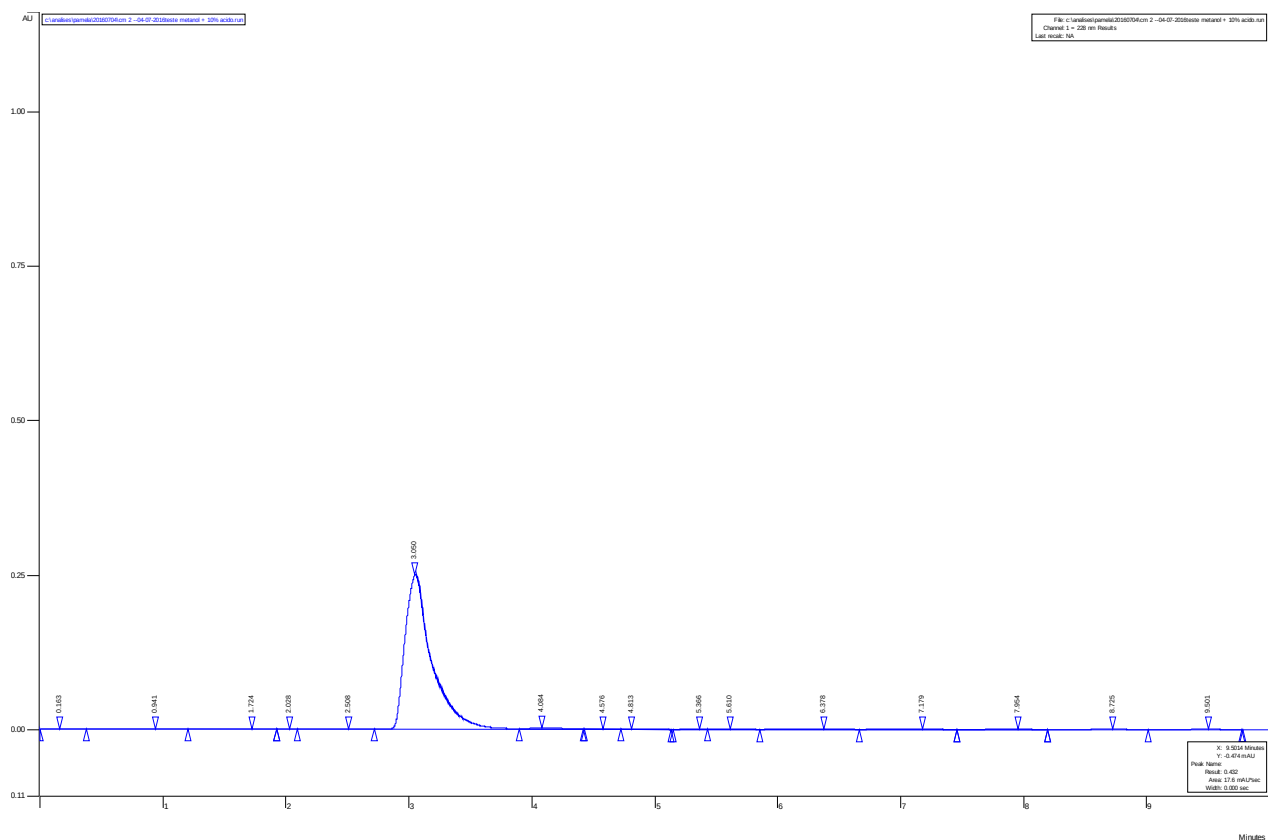


Figura 22 - Cromatograma referente a curva analítica com concentração 0,1 mg/ml em metanol

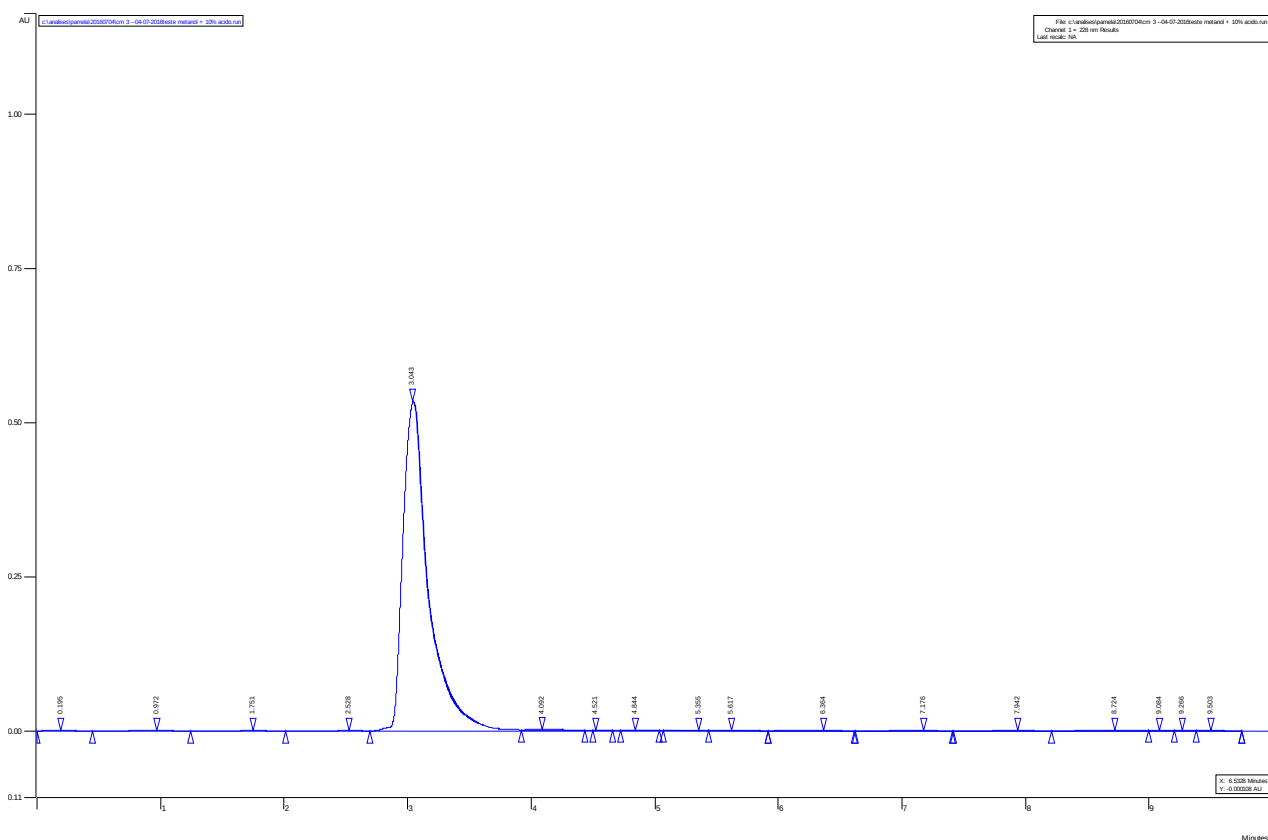


Figura 23 - Cromatograma referente a curva analítica com concentração 0,2 mg/ml em metanol

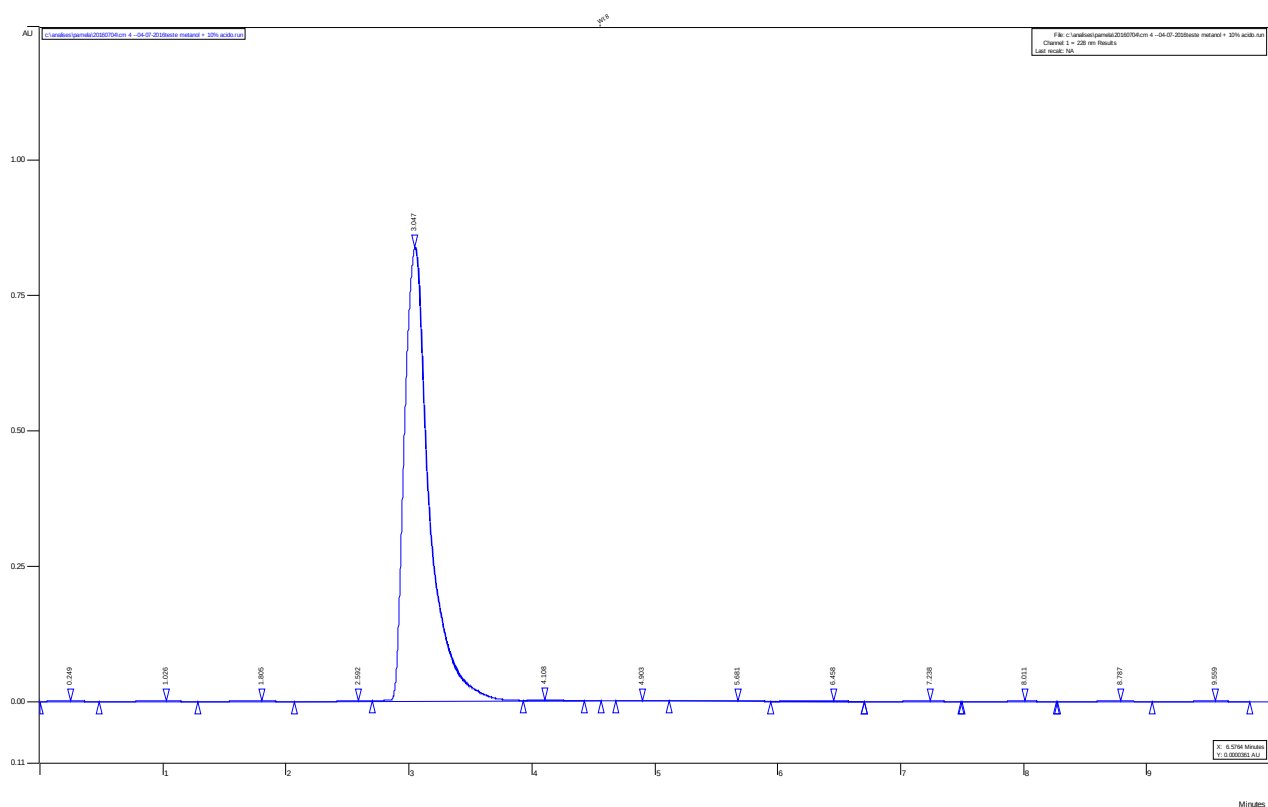


Figura 24 - Cromatograma referente a curva analítica com concentração 0,3 mg/ml em metanol

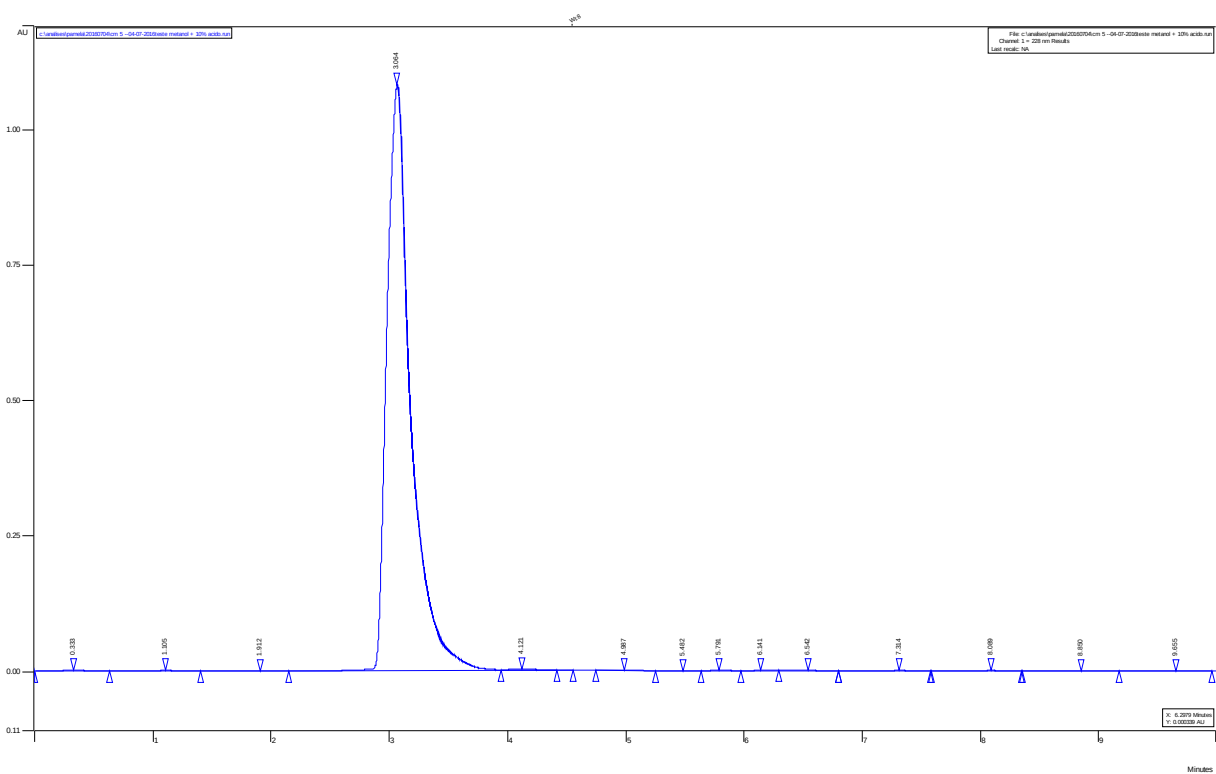


Figura 25 - Cromatograma referente a curva analítica com concentração 0,4 mg/ml em metanol

É realizado o Teste de Grubbs para analisar a existência de valores aberrantes ou não entre as triplicatas para cada concentração. O $G_{\text{calculado}}$ é comparado com o valor do G_{tabelado} , em que quando $G_{\text{calculado}} > G_{\text{tabelado}}$, o valor suspeito é aberrante. O valor de G_{tabelado} para uma triplicada é de 1,155.

O Teste de Grubbs foi feito para todas as concentrações da curva analítica, utilizando a seguinte equação:

$$G_{\text{Calc}} = \frac{|X_i - \bar{X}|}{S}$$

Em que X_i é o valor suspeito, \bar{X} é o valor médio da triplicada e S é o desvio padrão. Na Tabela 5 encontra-se os valores obtidos de $G_{\text{calculado}}$ para cada concentração.

Tabela 5 – Dados e valores obtidos para a determinação do $G_{\text{calculado}}$.

Concentração (mg/ml)	Áreas (mAU*sec)	Média das áreas	Valor suspeito	Desvio Padrão	Gcalc
0,05	2034	2023,67	2034	9,07	1,139
	2017				
	2020				
0,1	3873	3864,33	3846	15,89	1,154
	3874				
	3846				
0,2	7849	7870,33	7849	18,9	1,129
	7877				
	7885				
0,3	11779	11707	11779	62,39	1,154
	11669				
	11673				
0,4	16200	15733,33	16200	450,92	1,035
	15300				
	15700				

Após determinado os valores de $G_{\text{calculado}}$ para todas as concentrações constatou-se que não há nenhum valor aberrante, pois, todos os $G_{\text{calculados}}$ foram

menores do que 1,155. Então não sendo necessário descartar nenhum valor. Pode-se então realizar o Teste de Cochran para poder verificar a homocedasticidade.

Para o Teste de Cochran foi utilizado a seguinte fórmula:

$$C_{Calc} = \frac{S_{Maior}^2}{\sum S^2}$$

Em que S_{Maior}^2 é o valor da maior variância, e $\sum S^2$ é a soma das variâncias. O valor de C_{tab} para a triplicata é de 0,684. Na Tabela 6 encontra-se os valores da variância para cada concentração.

Tabela 6 – Dados para a determinação do $C_{Calculado}$

Concentração (mg/ml)	Áreas (mAU*sec)	Média das áreas (mAU*sec)	Desvio Padrão	Variância
0,050	2034	2023,67	9,07	82,26
	2017			
	2020			
0,10	3873	3864,33	15,89	252,49
	3874			
	3846			
0,20	7849	7870,33	18,9	357,21
	7877			
	7885			
0,30	11779	11707	62,39	3892,51
	11669			
	11673			
0,40	16200	15733,33	450,92	203328,8
	15300			
	15700			
Σ = 207913,27				

O C_{calc} foi de 0,978, o que caracteriza um comportamento heterocedástico pois $C_{calc} > C_{tab}$.

Com isso foi feito então a curva analítica, na qual está representada na figura 26 e na tabela 7 os dados obtidos para o y previsto, que é calculado utilizando a concentração na equação $Y=5,181+39212,15X$. A diferença entre o y previsto e o y obtido do equipamento é o que se chama de resíduo, e estes podem ser vistos na Figura 27 e na Tabela 7.

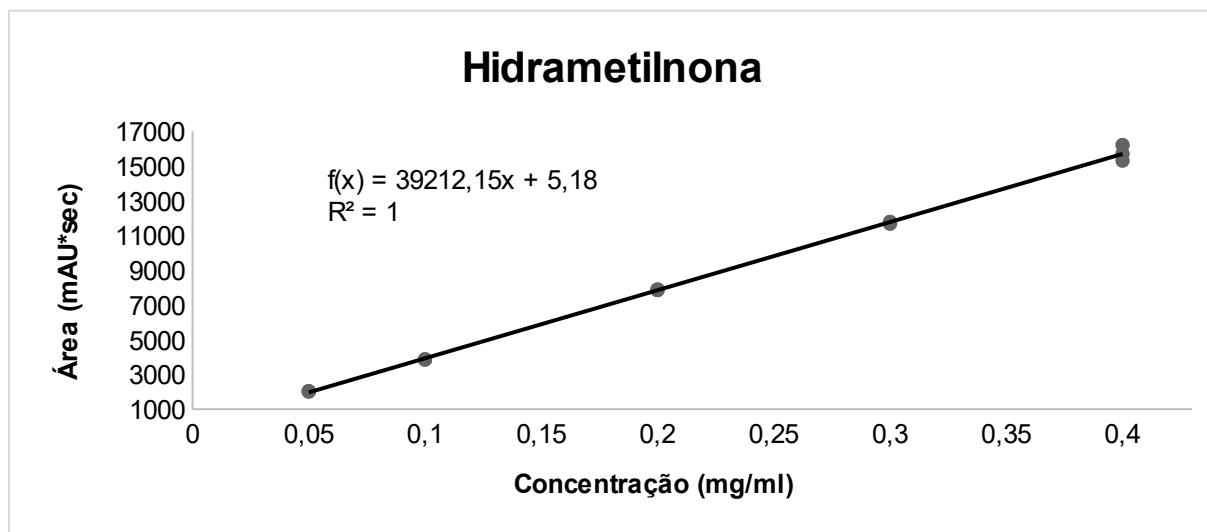


Figura 26 - Curva analítica da hidrametilnona obtida da análise por CLAE-UV

A partir da Figura 26 e da equação da curva, o método mostrou-se linear possuindo um R^2 bem próximo de 1, ou seja, a variável independente X consegue explicar quase todas as variáveis dependentes Y.

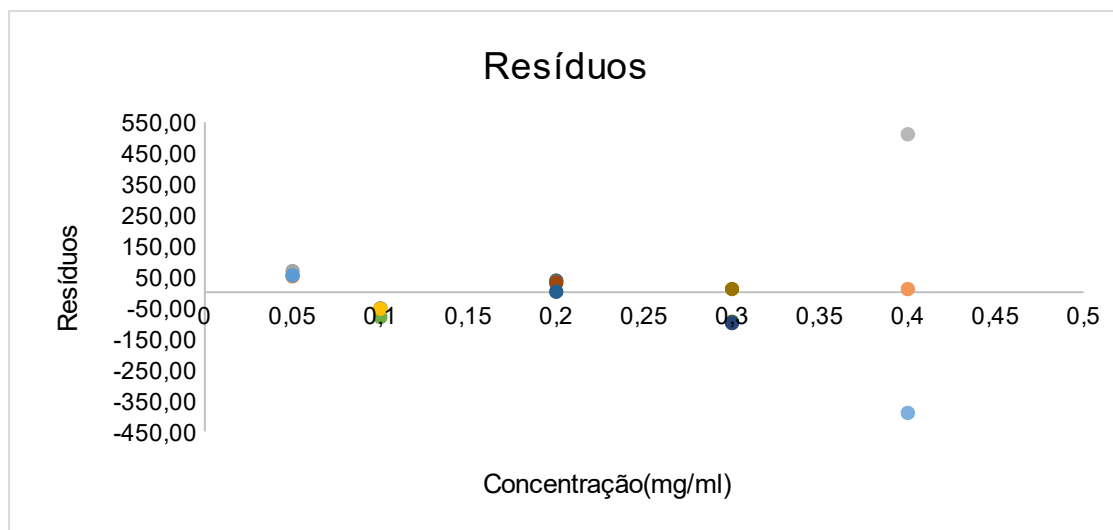


Figura 27 - Gráfico representando os resíduos obtidos pela diferença entre o y previsto e o y obtido

Tabela 7 – Resultados de resíduos

Observação	Y previsto	Resíduo
1	1965,79	54,21
2	1965,79	51,21
3	1965,79	68,21
4	3926,40	-53,40
5	3926,40	-52,40
6	3926,40	-80,40
7	7847,61	1,39
8	7847,61	29,39
9	7847,61	37,39
10	11768,83	10,17
11	11768,83	-99,83
12	11768,83	-95,83
13	15690,04	-390,04
14	15690,04	9,96
15	15690,04	509,96

Mesmo o método não sendo o ideal, que é de homocedasticidade, foi possível utilizar esta curva para as próximas análises, pois neste caso não está sendo analisado traços e sim grande quantidade. Na Figura 26, temos que os primeiros quatro pontos estão coincidentes um com o outro, somente o último ponto referente a última concentração é que possui uma pequena dispersão. Um outro ponto importante é que a curva analítica é 1000 vezes maior que o limite de detecção, ou seja, o fato de ela ser heterocedástica não irá influenciar nos resultados. Porém é necessário que o método seja refeito para que seja obtido um método homocedástico. Uma sugestão é que seja refeito o último ponto com, mas triplicatas, para garantir que não tenha dispersão.

Com os dados da curva analítica é obtido que $F_{\text{calculado}} = 10781,5247$ e o $F_{\text{tabelado}} = 2,29964 \times 10^{-20}$. Quando o F calculado é maior que o F tabelado tem-se a existência de uma correlação entre o x e o y, e como pode ser visto, essa correlação existe.

4.5. GRAU DE RECUPERAÇÃO

Para o grau de recuperação, obtive que a homogeneização foi mais eficiente quando era realizada por 30 min e sendo confirmado que o acetato de etila é o solvente mais adequado para a extração.

Na tabela 8 encontra-se os resultados obtidos para a extração realizada com acetato de etila na qual utilizou 2,6 mg de HMN, que resultou na obtenção da amostra com a eluição do diclorometano. Para o cálculo da % do grau de recuperação é utilizado a seguinte equação: $\% = (\text{massa obtida} / \text{massa teórica}) \times 100$. Em que a massa obtida foi a massa pesada no balão após a rotaevaporação, e a massa teórica de HMN foi de 0,260 mg, pois foi retirado 5,00 g da mistura de 50,00g de arroz contaminados com 2,6mg de HMN.

Tabela 8 – Dados obtidos para determinação da % de recuperação

Amostra	Tempo (min)	Absorvância (mAU)	Área (mAU*sec)	Média das Áreas (mAU*sec)	Massa obtida (mg)	%
GR1	4,18	603	9590	9447,5	0,241	92,6
	4,17	567	8585 X			

	4,14	600	9305			
	4,18	239	3545			
GR2	4,39	226	3378	3461,5	0,088	33,9
	4,35	222	3145 X			
	4,18	234	3991 X			
GR3	4,14	241	3784	3820	0,097	37,4
	4,16	232	3855			

O valor baixo para GR2 e GR3 pode ser atribuído ao fato de que a hidrametilnona não estava uniformemente distribuída pela matriz, estando ela principalmente na parte superior, aonde foi coletado o GR1. Sendo necessário então uma melhor homogeneização da mistura arroz e HMN, ou seja, é necessário que o método seja refeito.

Uma forma de melhorar o rendimento do método, seria a possibilidade de alterar a forma de extração utilizando algum outro método, como por exemplo, o ultrassom.

4.6. CONTAMINAÇÃO DA MATRIZ

A contaminação da matriz de arroz, feijão e frango desfiado com aproximadamente 10,00 g de uma isca comercial foi analisada por 84 dias. Durante esse período foi observado uma mudança física tanto nas amostras quanto nos brancos. No primeiro dia consistia de pedaços dos alimentos, e com o passar dos dias as amostras ficaram com aspecto de um purê grosso com pequenos pedaços de alimentos e com um odor de podridão. Já os brancos ficaram com o passar das semanas cada vez mais líquidos e com presença de pequenos pedaços de alimentos e também com o odor forte de podre. O pH teve um leve decaimento ao longo das semanas, na Tabela 9 e na Figura 28 encontra-se os valores de pH para as amostras e para os brancos ao longo dos 84 dias. A partir disso pode-se dizer que o pH não influenciou na determinação da HMN ao longo das análises. Uma comparação que pode ser feita é com o estudo de Subhasish Chakraborty e seus colaboradores (1993) em que os resultados obtidos foram que independentemente do pH se tem uma decomposição da HMN ao longo das análises. Para a extração das amostras via-se que a solução amarela clareava com o passar das semanas

como era o esperado. E que nos brancos era obtido soluções transparentes. A utilização de uma quantidade menor de solvente tanto na extração quanto no processo de clean-up, com relação ao grau de recuperação, foi devido a quantidade de amostra ser menor na contaminação. No grau de recuperação usou-se 5g de amostra, já na contaminação 1,5g, com isso tem-se a redução da quantidade de solvente a ser utilizada. A utilização de 1,50g de alimento na contaminação, foi para que a concentração caísse dentro da curva analítica. Como no processo de clean-up, no item 3.1.2 (pág. 8), para a eluição do acetato de etila, foi obtida uma solução transparente, garantindo então que toda a amostra era eluída com o diclorometano, optou-se pela não utilização desse solvente nessa etapa de contaminação. Para os brancos, as soluções obtidas tanto com a eluição com o hexano quanto com o diclorometano foram transparentes ao longo de toda a análise. Nas Tabela 10 e 11 encontra-se os dados obtidos pela análise em CLAE-UV e a determinação da quantidade de HMN obtida ao longo dos 84 dias. E nas Figuras 30, 31, 32, 33, 34 e 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 e 43 estão representados os cromatogramas dessas análises.

Tabela 9 – pH das amostras contaminadas e dos brancos ao longo dos 84 dias da contaminação.

	pH						
	1 ^a	3 ^a	5 ^a	7 ^a	9 ^a	11 ^a	13 ^a
	semana	semana	semana	semana	semana	semana	semana
Amostra 1	5,41	5,36	5,30	5,18	5,12	5,01	5,03
Amostra 2	5,44	5,28	5,20	5,05	5,18	5,06	5,10
Amostra 3	5,15	5,31	5,05	4,88	4,96	4,90	5,05
Branco 1	5,85	5,46	4,87	4,72	4,92	4,81	5,57
Branco 2	5,72	5,32	4,99	4,92	4,85	4,72	5,06

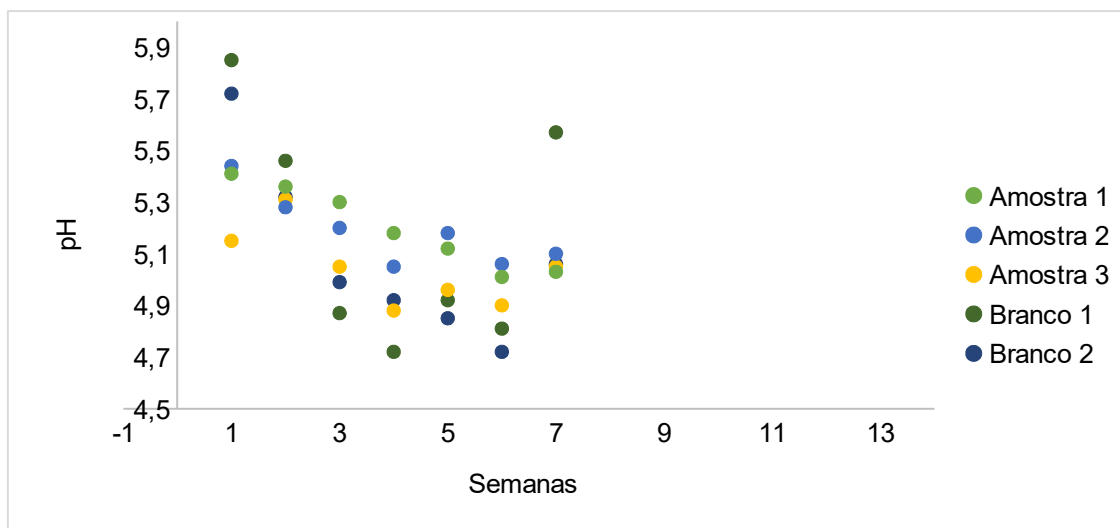


Figura 28 - Gráfico referente ao pH das amostras e dos brancos ao longo dos 84 dias.

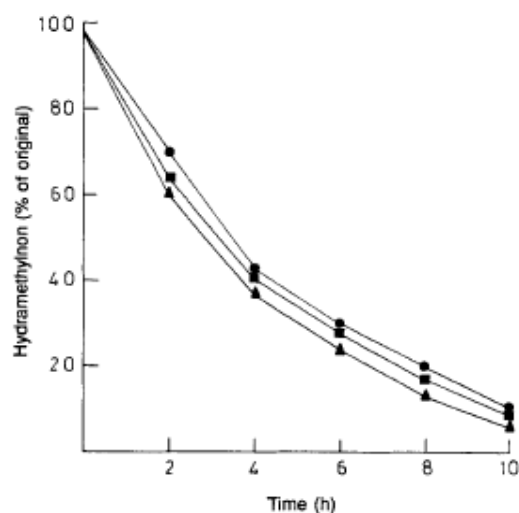


Fig. 1. Photodecomposition of hydramethylnon in aqueous medium at (●) pH 4.8, (■) pH 6.5 and (▲) pH 8.0.

Figura 29 - Gráfico relacionando a quantidade de HMN com o pH. Resultado obtido pelo estudo de Subhasish Chakraborty e seus colaboradores (1993)

Tabela 10 – Dados obtidos pela análise em CLAE-UV para as amostras e a determinação da quantidade de HMN ainda presente nas amostras da 1ª à 7ª semana.

	Amostra	Tempo (min)	Absorvância (mAU)	Área (mAU*sec)	Média das áreas (mAU*sec)	Concentração (mg/ml)	mg/g
1ª semana	AM1	4,28	620	10419	10408	0,27	0,176
		4,28	624	10397			
		4,28	629	10467 X			
	AM2	4,22	392	6076	6069	0,15	0,103
		4,20	392	6011 X			

3ª semana	AM3	4,21	394	6062	14845	0,38	0,252
		4,32	766	14876			
		4,32	764	14814			
		4,33	767	14956 X			
	AM1	4,21	427	6775 X	6612,5	0,17	0,112
		4,20	419	6635			
		4,21	417	6590			
	AM2	4,18	375	6298	6345	0,16	0,108
		4,21	366	6392			
		4,14	383	6512 X			
	AM3	4,24	465	8089	8098,5	0,21	0,137
		4,23	470	8209 X			
		4,22	488	8108			
5ª semana	AM1	4,13	523	8893 X	8594	0,22	0,145
		4,23	511	8600			
		4,22	530	8588			
	AM2	4,13	330	5681	5726,5	0,15	0,097
		4,13	333	6531 X			
		4,13	335	5772			
	AM3	4,16	565	9924	9977,5	0,25	0,169
		4,17	560	10695 X			
		4,16	539	10031			
	AM1	4,10	512	8135	7966,5	0,2	0,135
		4,13	541	8602 X			
		4,14	515	7798			
7ª semana	AM2	4,08	305	4530 X	4393,5	0,11	0,074
		4,06	300	4375			
		4,06	301	4412			
	AM3	4,10	483	7323 X	7679	0,2	0,130
		4,09	493	7570			
		4,06	471	7788			

Tabela 11 – Dados obtidos pela análise em CLAE-UV para as amostras e a determinação da quantidade de HMN ainda presente nas amostras da 9ª à 13ª semana.

	Amostra	Tempo (min)	Absorvância (mAU)	Área (mAU*sec)	Média das áreas (mAU*sec)	Cocentração (mg/ml)	mg/g
9ª semana	AM1	4,13	463	6712	6723,5	0,17	0,114
		4,12	466	6735			
		4,07	429	6327 X			
	AM2	4,16	448	6749	6792,5	0,17	0,115
		4,12	443	6836			
		4,07	450	6620 X			
	AM3	4,15	517	7794	7919	0,2	0,134
		4,15	512	8044			
		4,11	519	8231			
11ª	AM1	4,16	547	8139 X	8396,5	0,21	0,142

semana	AM2	4,19	54	8351	6401	0,16	0,108
		4,20	556	8442			
		4,12	387	6504 X			
		4,15	386	6392			
		4,15	383	6410			
	AM3	4,13	406	6004	6025	0,15	0,102
		4,13	414	6046			
		4,14	420	6322 X			
13ª semana	AM1	4,19	529	8985 X	7978,5	0,2	0,135
		4,23	529	7952			
		4,25	546	8005			
	AM2	4,19	355	5330 X	5062,5	0,13	0,086
		4,06	339	5013			
		4,16	337	5112			
	AM3	4,12	219	3004	3090	0,08	0,052
		4,10	223	3176			
		4,15	224	3416 X			

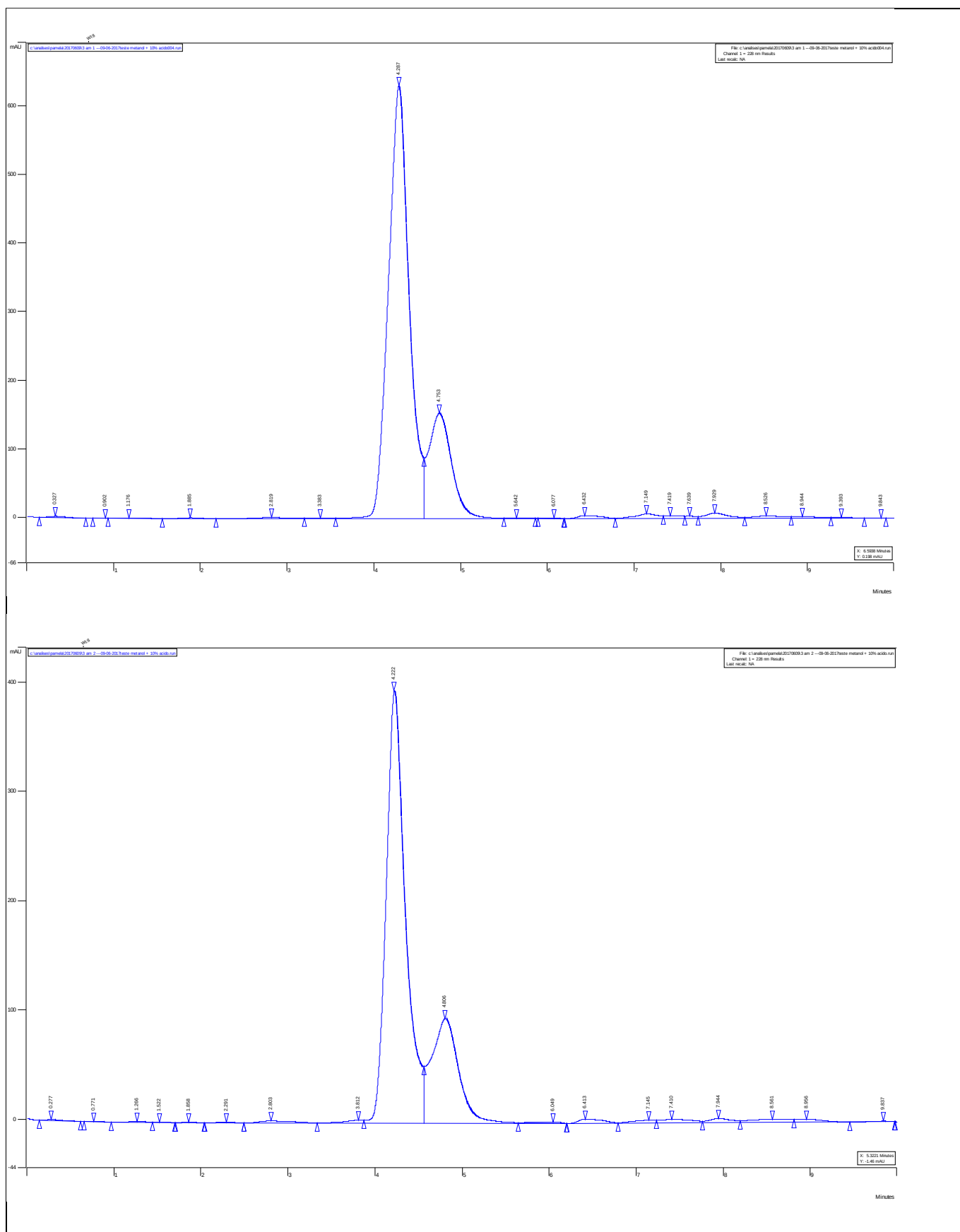


Figura 30 - Cromatogramas referentes a primeira semana de contaminação. De cima para baixo, Amostra 1 e Amostra 2.

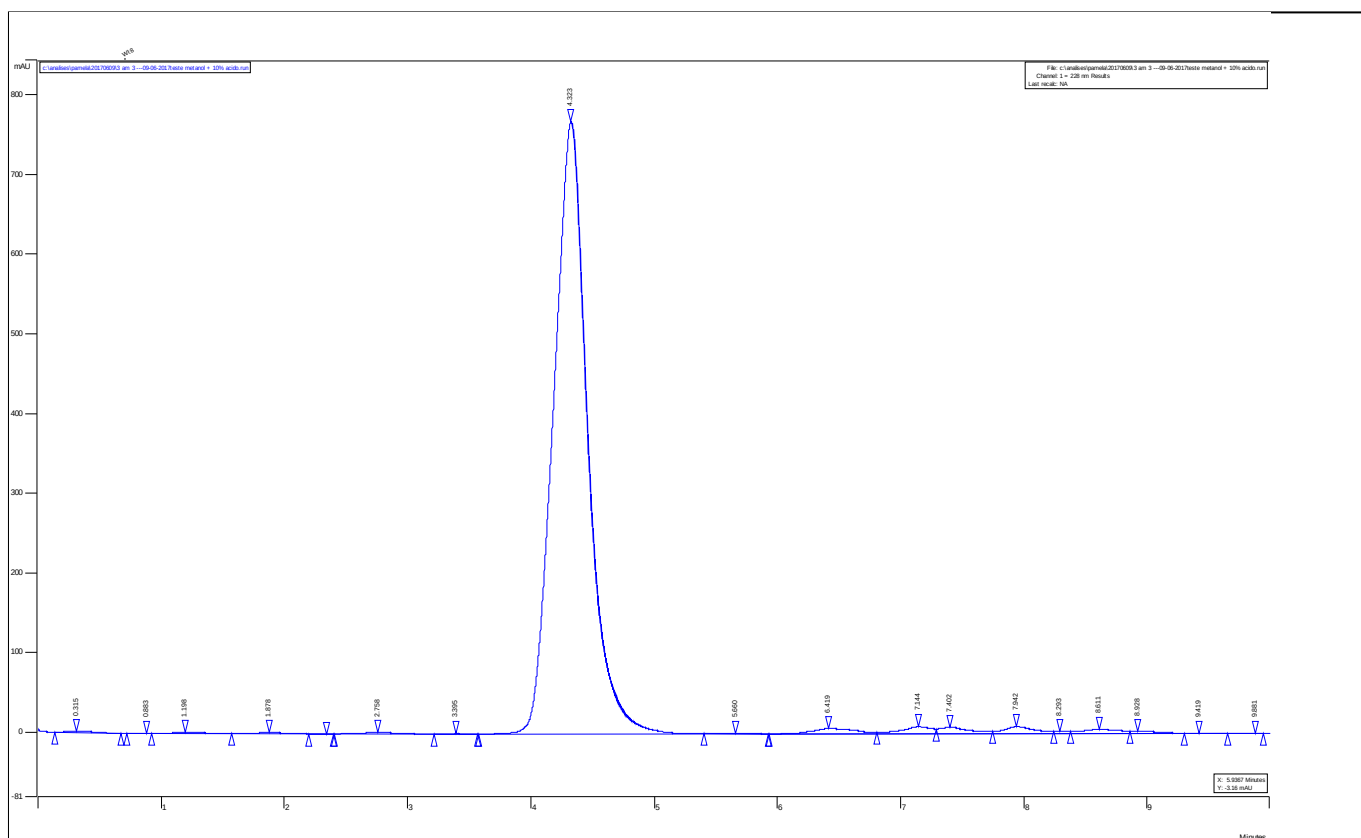
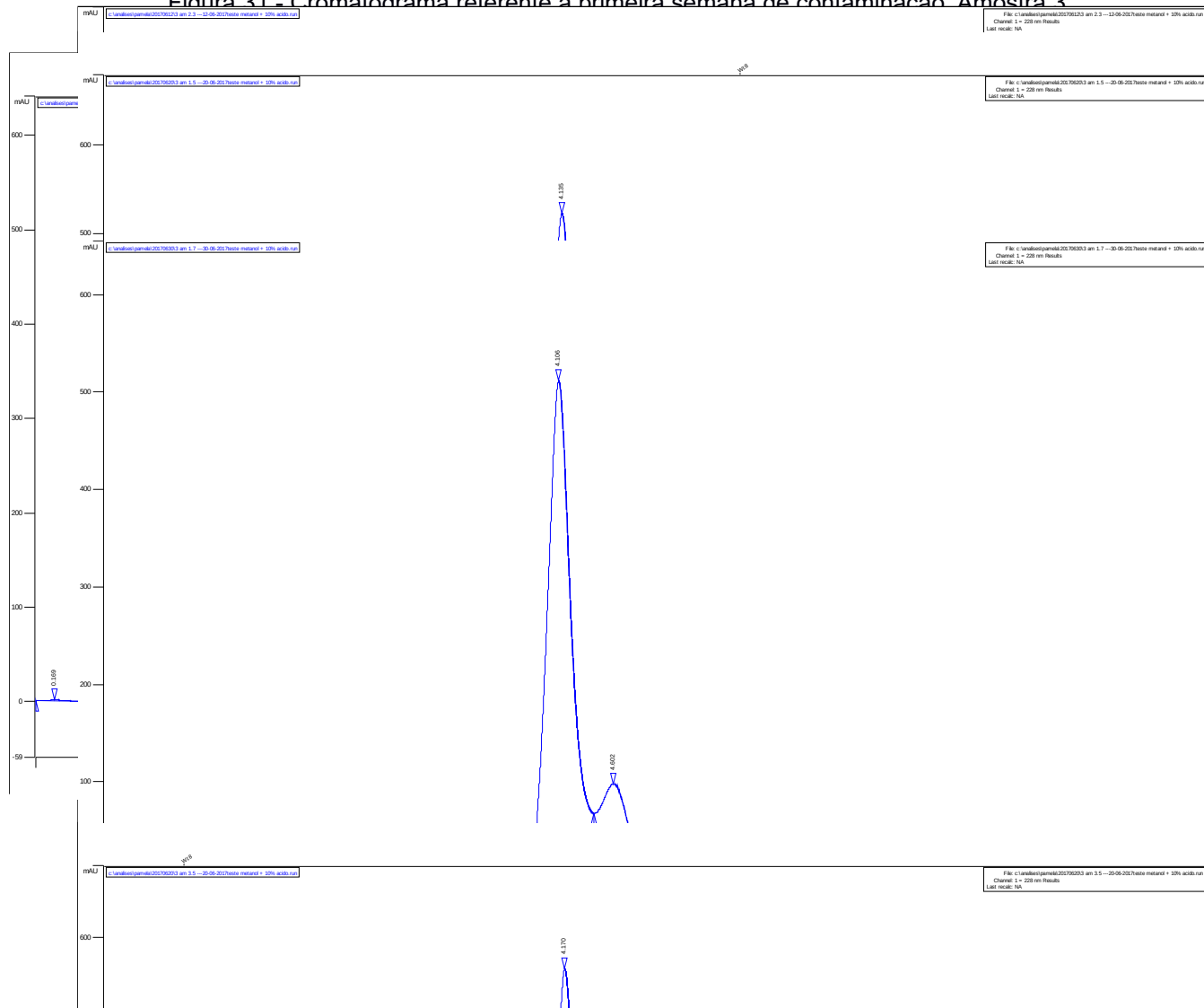


Figura 31 - Cromatograma referente a primeira semana de contaminação Amostra 3



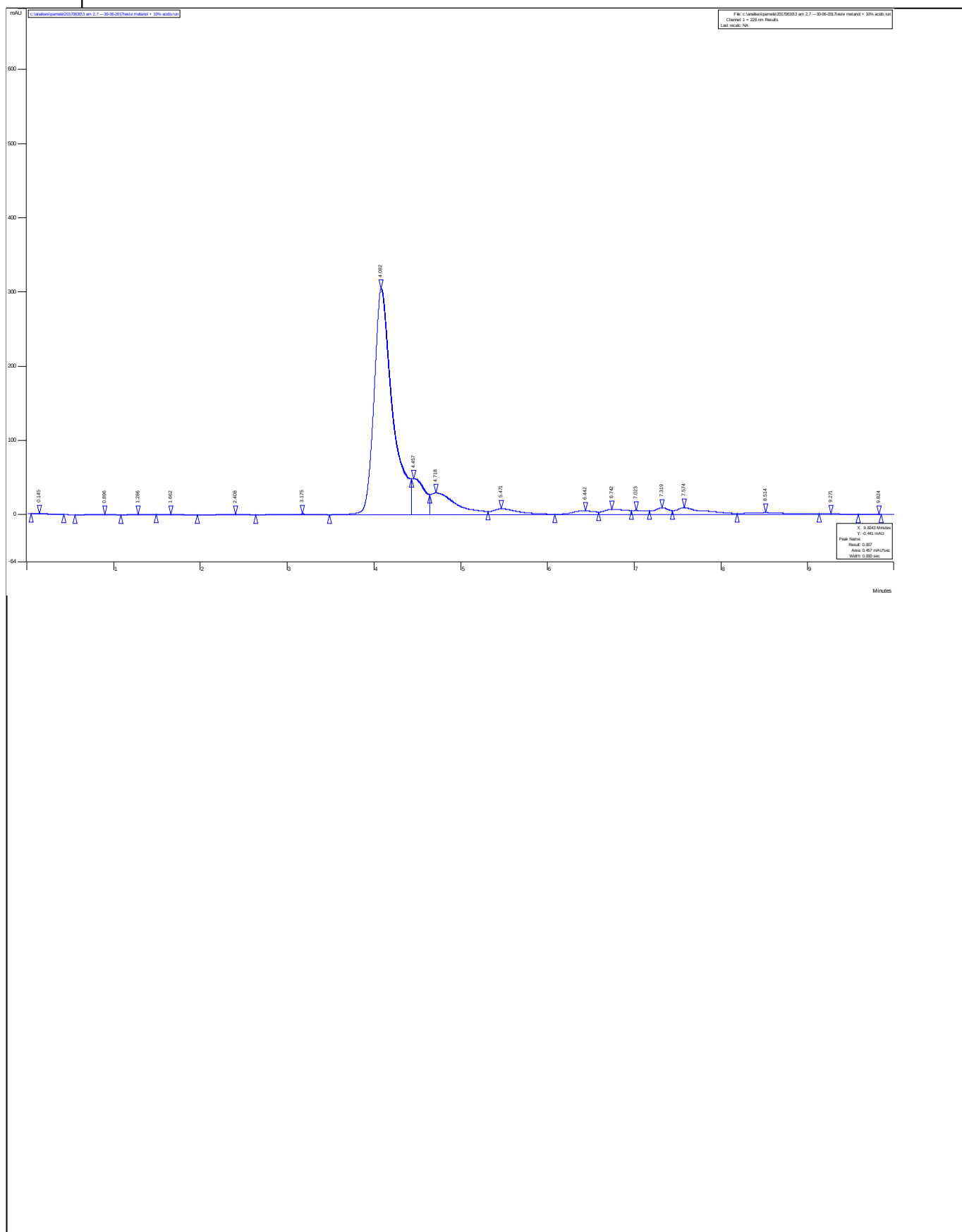


Figura 36 – Cromatogramas referentes a sétima semana de contaminação. De cima para baixo: Amostra 2 e



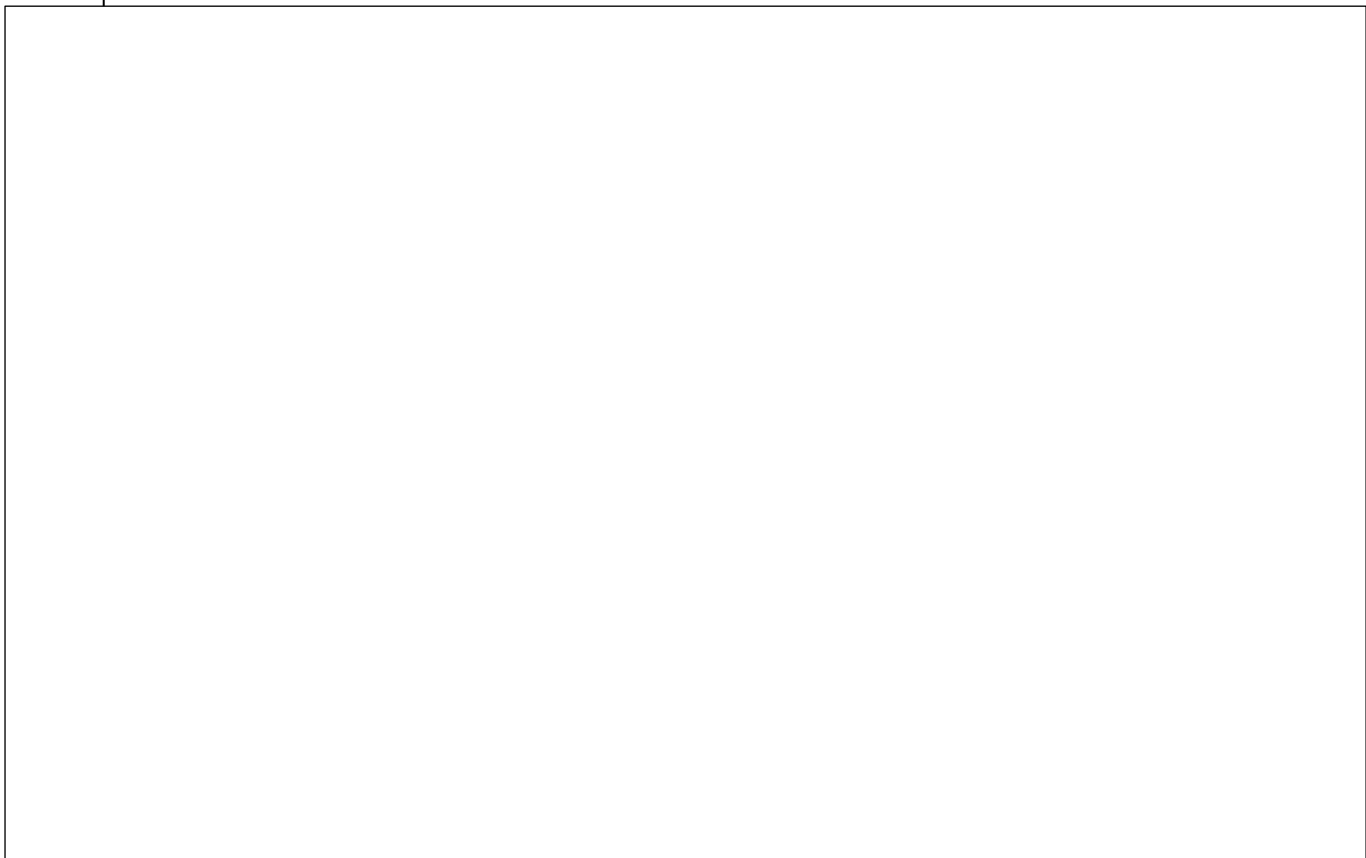


Figura 39 - Cromatograma referente a nona semana de contaminação, Amostra 3.

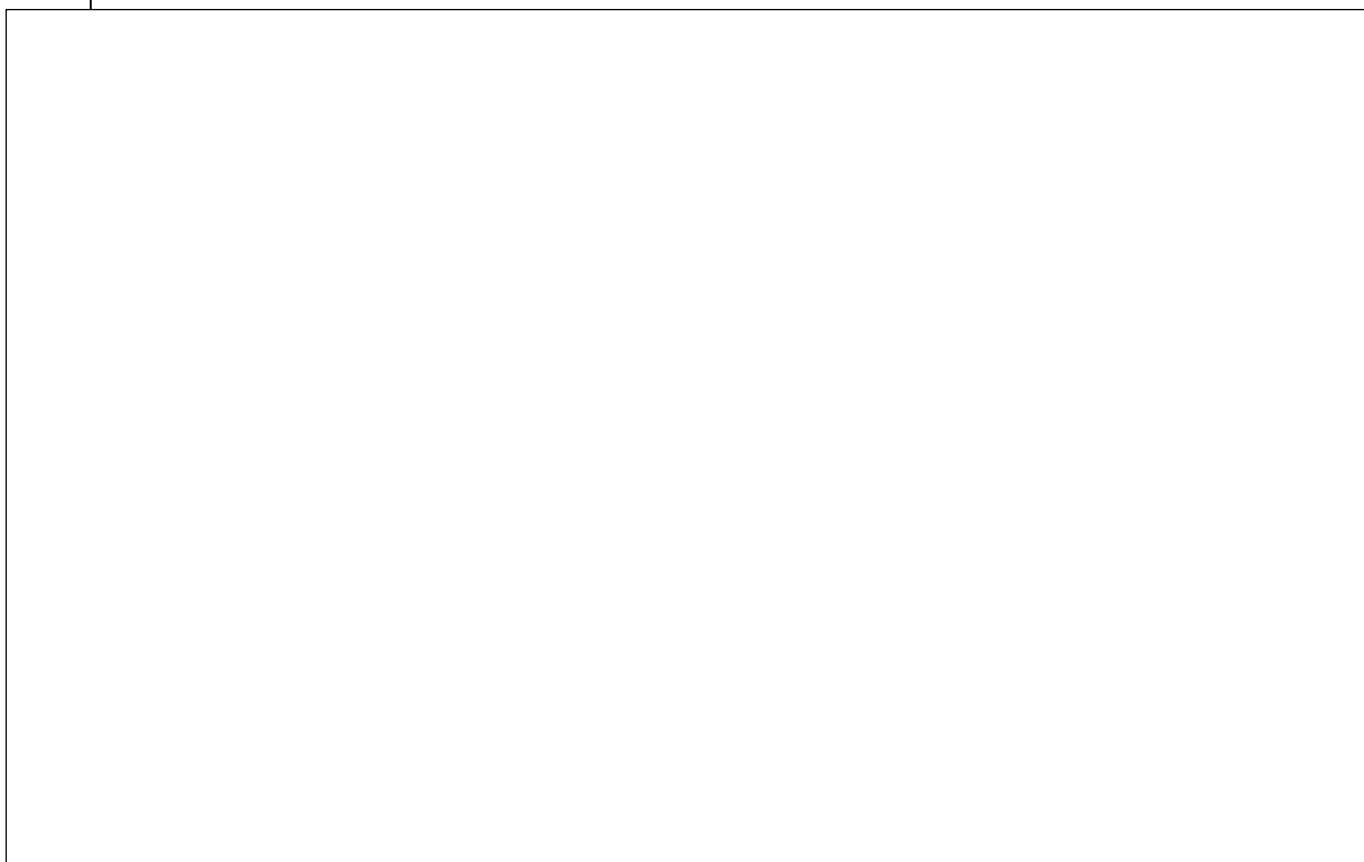


Figura 40 - Cromatograma referente a décima primeira semana de contaminaminação, Amostra 1.

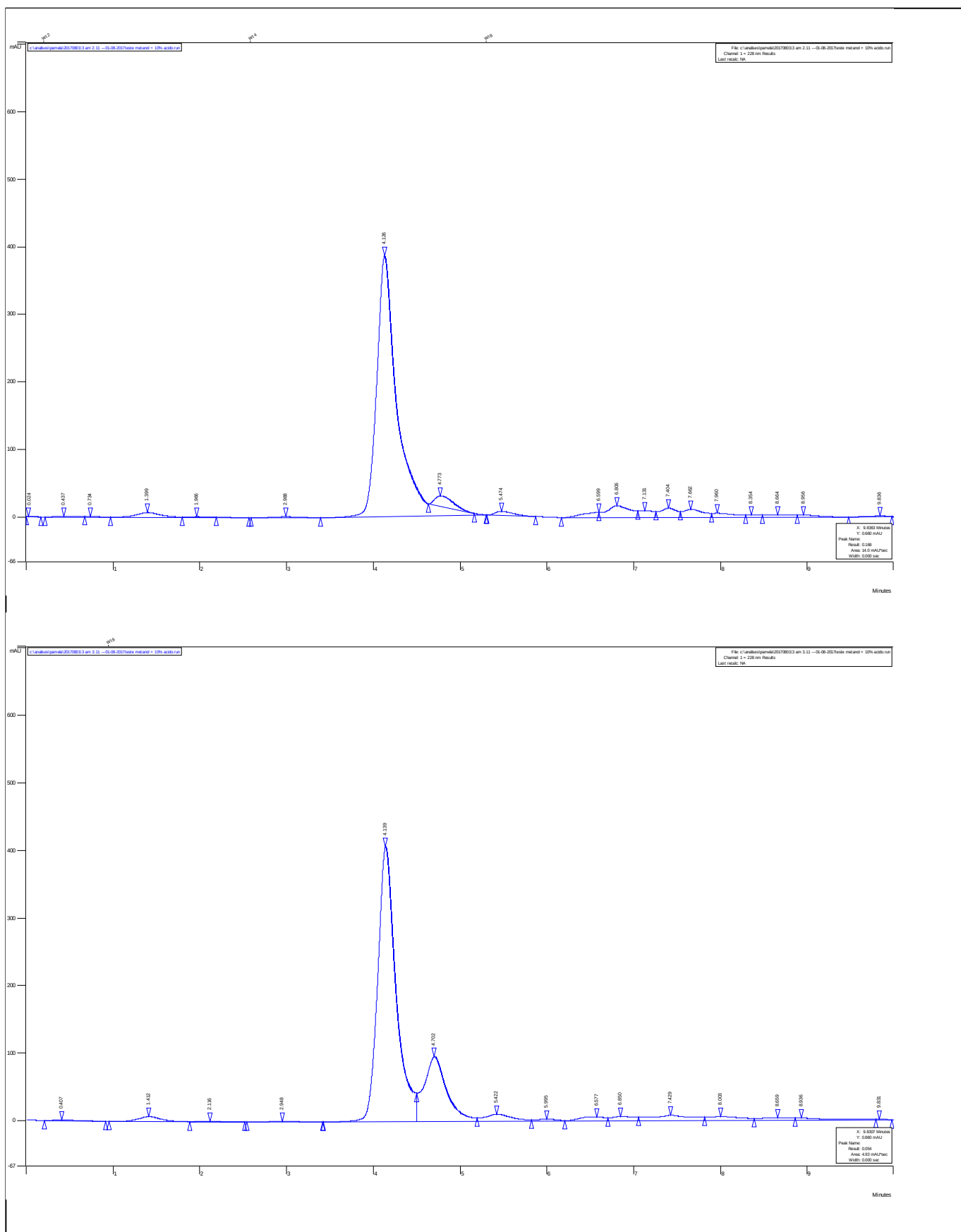


Figura 38 - Cromatogramas referentes a décima primeira semana de contaminação. De cima para baixo, Amostra 1

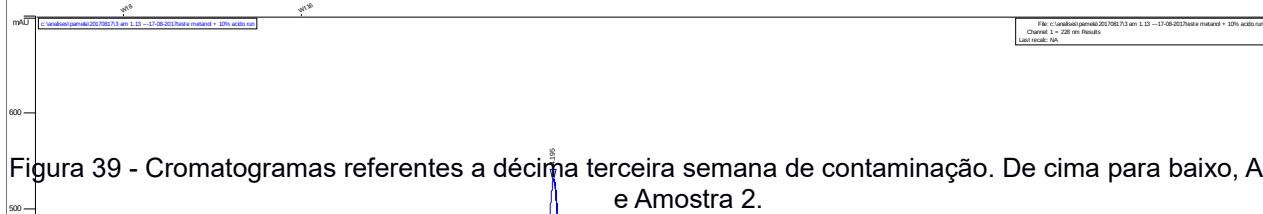


Figura 39 - Cromatogramas referentes a décima terceira semana de contaminação. De cima para baixo, Amostra 1 e Amostra 2.

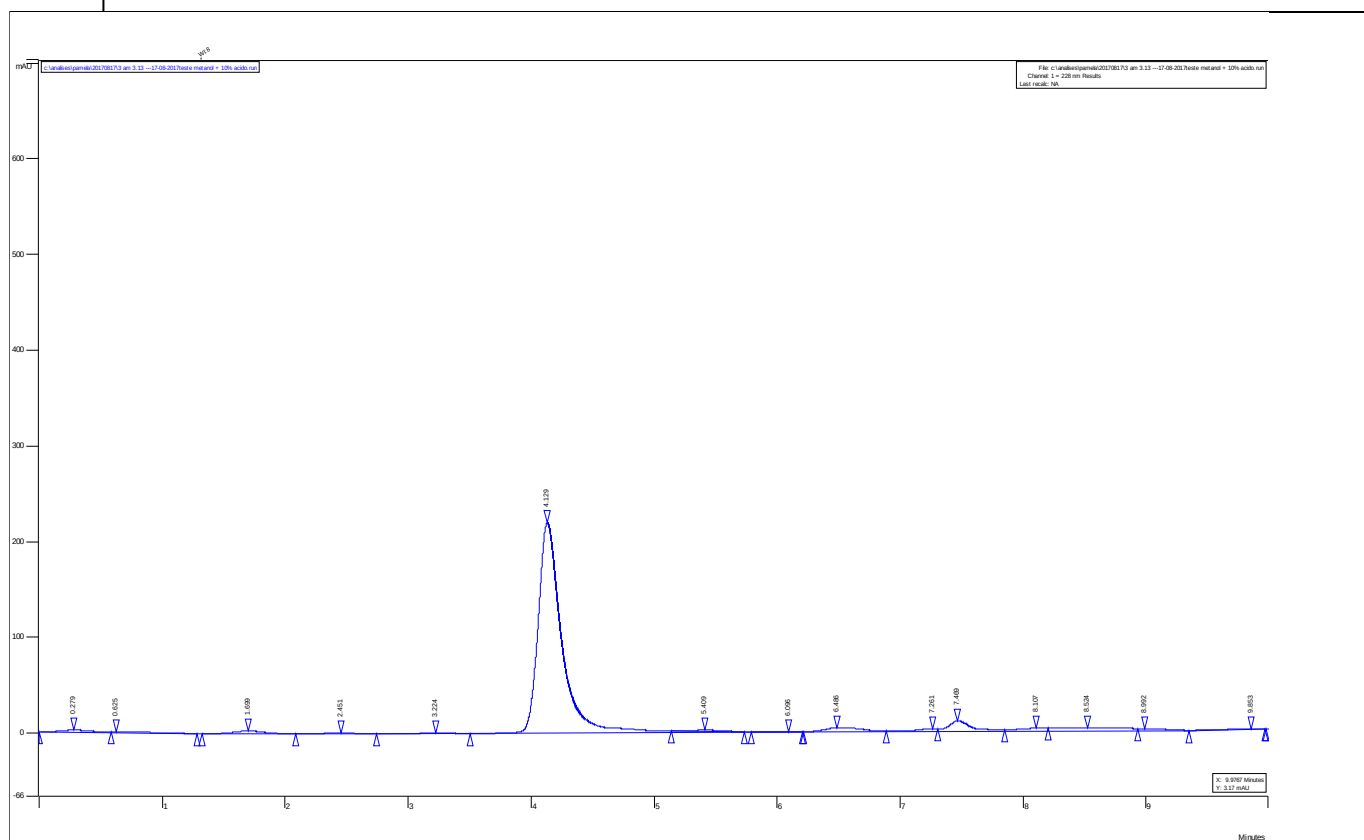


Figura 40 - Cromatograma referente a décima terceira semana de contaminação, Amostra 3.

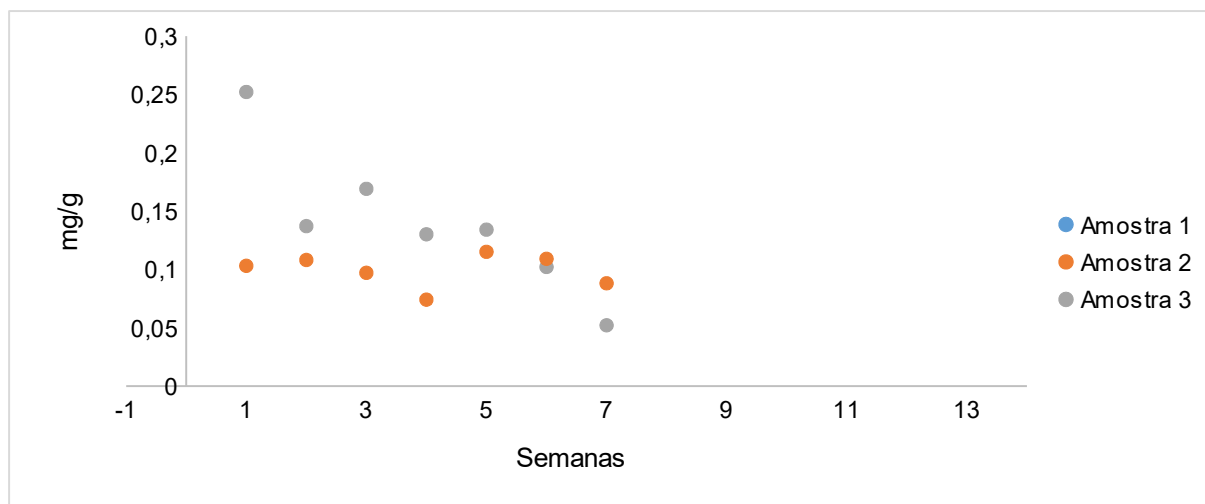


Figura 41 - Gráfico representando as quantidades de extratos obtidos ao longo dos 84 dias.

Tabela 12 – Dados das quantidades obtidas de extratos ao longo dos 84 dias.

	1 ^a semana (mg/g)	3 ^a seman a (mg/g)	5 ^a semana (mg/g)	7 ^a semana (mg/g)	9 ^a semana (mg/g)	11 ^a semana (mg/g)	13 ^a semana (mg/g)
Amostra 1	0,176	0,112	0,145	0,135	0,114	0,140	0,144
Amostra 2	0,103	0,108	0,097	0,074	0,115	0,109	0,088
Amostra 3	0,252	0,137	0,169	0,130	0,134	0,102	0,052

5. CONCLUSÃO

O método de extração precisa ser refeito, para incluir o processo de clean-up, para poder obter um resultado mais confiável. Contudo o acetato de etila foi escolhido como o solvente mais adequado para fazer a extração da hidrametilnona presente em iscas comerciais nas condições realizadas.

O método de clean-up mostrou ser eficiente para o presente estudo, em que a utilização da alumina como adsorvente é o mais eficiente e que com a eluição do diclorometano se obtém a HMN.

O limite de detecção do método para a hidrametilnona é de 5×10^{-4} mg/ml.

O grau de recuperação para o método aplicado precisa ser refeito, utilizando uma matriz mais adequada, como uma mistura de arroz, feijão e frango.

Mesmo a curva analítica obtida sendo heterocedastica, ela pode ser usada para as análises nesse estudo, devido a análise ser em grandes quantidades e pelo fato de ela ser 1000 vezes maior que o limite de detecção. Porém a curva analítica é necessária ser refeita sempre que for fazer um novo estudo.

A matriz, composta por arroz, feijão e frango desfiado, contaminada com uma isca comercial foi analisada por CLAE-UV com um tempo de análise cromatográfica de 10 min. Para o a análise completa de uma amostra, desde a extração até a análise no cromatógrafo tem-se um tempo total de análise de 1h40min.

Chegasse então a conclusão de que para a contaminação de uma matriz composta de alimentos próprios para o consumo com uma isca comercial, tem-se que a HMN permanece na matriz mesmo depois de 84 dias.

Quando o perito recebe uma evidencia nem sempre se sabe há quanto tempo esta foi coletada. No caso da HMN esse tempo indeterminado não faria muita diferença pois como ela permanece por um longo período na matriz, é possível determina-la sem que haja um falso negativo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] BRINER, R.C.. Forensic Chemistry. **J. Chem. Educ.** 59 (1), p 41 (1982)
- [2] CRQ. Portal. Química Forense. Disponível em <http://www.crq4.org.br/qv_forense>. Acesso em: 29/06/2017
- [3] Fiocruz. Portal. Sinitox. Disponível em < <http://sinitox.icict.fiocruz.br/>>. Acesso em: 01/07/2017
- [4] Fiocruz. Portal. Casos Registrados de Intoxicação Humana, de Intoxicação Animal e de Solicitação de Informação por Região e por Centro. Brasil, 2013. Disponível em: <http://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//Tabela1_2013.pdf>. Acesso em: 01/07/2017
- [5] Fiocruz. Portal. Evolução dos Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico. Brasil, 2013. Disponível em: <http://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//Tabela10_2013.pdf>. Acesso em: 01/07/2017.
- [6] CHAKRABORTY, K. SUBHASISH; BHATTACHARYYA, ANJAN; CHOWDHURY, ASHIM. Phototransformation of the Insecticide Hydramethylnon in Aqueous Systems – **Pestic. Sci.** 37, 73-77(1993)
- [7] ABERNETHY, GRANT A.; WALKER, JOHN R.L.. Degradation of the insecticide Hydramethylnon by *Phanerochaete chrysosporium* – **Biodegradation** 4: 131-139, (1993)
- [8] Insecticides: Chemistries and Characteristics 2nd Edition. Disponível em: <<https://ipmworld.umn.edu/bloomquist-insecticides>>. Acesso em: 01/07/2017.
- [9] BUENO, F.C.; FORTI, L.C.; BUENO, O.C.. Toxicity of Hydramethylnon to the

Leaf-cutting Ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) – **Sociobiology** 60(2): 150-153 (2013)

[10] DECIO, PÂMELA; SILVA-ZACARIN, ELAINE C.M.; BUENO, FABIANA C.; BUENO, ODAIR C.. Toxicological and histopathological effects of hydramethylnon on *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers – **Micron** 45 22-31(2013)

[11] HOOPER-BÙI, LINDA M.; RUST, MICHAEL K.. An oral bioassay for the toxicity of hydramethylnon to individual workers and queens of Argentine ants, *Linepithema humile*. – **Pest. Management Science** 57:1011-1016 (2001).

[12] MALLIPUDI, N. MOORTHY; STOUT, STEVEN J.; LEE, AN-HORNG; ORLOSKI, EDWARD J.. Photolysis of AMDRO Fire Ant Insecticide Active Ingredient Hydramethylnon (AC 217,300) in Distilled Water – **J. Agric. Food Chem.** 34, 1050-1057 (1986)

[13] MEER, ROBERT K. V.; WILLIAMS, DAVID F.; LOFGREN, CLIFFORD S.. Degradation of the Toxicant AC 217,300 in Amdro Imported Fire Ant Bait under Field Conditions – **J. Agric. Food Chem.**, Vol. 30, No. 6, (1982)

[14] UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Reregistration Eligibility Decision. (RED) Hydramethylnon. **EPA** 738-R-98-023 December (1998)

[15] BACEY, JUANITA. Environmental Fate of Hydramethylnon. **Environmental Monitoring & Pest Management Branch**.

[16] Cromatografia um breve ensaio. 1998. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc07/Atual.pdf>>. Acesso em:04/07/2017.

[17] Introdução a métodos cromatográficos – Carol Collins, Gilberto Braga e Pierina Bonato – Editora da Unicamp – 4ª ed.

[18] Cromatografia Princípios básicos e Técnicas afins – Francisco Radler e Denise da Silva – Editora Interciência 2003

[19] Cromatografia em coluna: Dicas. Disponível em: <<http://nuquiocat.quimica.blumenau.ufsc.br/files/2016/07/Cromatografia-em-Coluna.pdf>>. Acesso em: 04/07/2017.

[20] An introduction to chromatography – David Abbott and R.S.Andrews – Editora Longman – 2ª ed

[21] HARRIS, DANIEL, C. Análise Química Quantitativa. Rio de Janeiro: Gen, 2012, 8ªEd.

[22] QUEIROZ, SONIA C.N.; COLLINS, CAROL H.; JARDIM, ISABEL C. S. F.. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. – **Química Nova**. Vol. 24, No. 1. (2001)

[23] HOLLINGSHAUS, J. GARY. Inhibition of Mitochondrial Electron Transport by Hydramethylnon: A new Amidinohydrazone Insecticide - **Pesticide Biochemistry and physiology** 27, 61-70 (1987)

[24] SILVERMAN, J.; VITALE, G.I.; SHAPAS, T.J.. Hydramethylnon Uptake by *Blattella germanica* (Orthoptera: Blattellidae) by coprophagy – **J. Econ. Entomol.** 84(1): 176-180 (1991)

[25] TAKAHASHI, KUNIIHIKO; MATSUMOTO, RYUJI; NEMOTO, SATORU; MATSUDA, RIEKO. Analytical Method of Hydramethylnon in Agricultural Products by LC-MS/MS. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**. 52(1):47-50. (2011).

[26] KOEHLER, PHILIP G.; PATTERSON, RICHARD S.. Toxicity of Hydramethylnon to laboratory and field strains of german cockroach (*Orthoptera: Blattellidae*). **Florida Entomologist** 74(2) (1991)

[27] REYZER, MICHELLE L.; BRODBELT, JENNIFER S.. Analysis of fire ant pesticides in water by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry or high-performance liquid chromatography/mass spectrometry – **Analytica Chimica Acta** 436 11-20(2001)

[28] TABARU, YUICHIRO; KOSEKI, TOSHIKO. The number of feces of the intoxicated German cockroaches, *Blattella germanica*, and delayed effects of hydramethylnon gel bait in the laboratory condition – **Med. Entomol. Zoo.** Vol 55 N°3 p.233-237 (2004)