

FLAVIANE APARECIDA DE SOUSA

**INFLUÊNCIA DO pH, DOS CONSTITUINTES DA MATRIZ E DO
ESTÁDIO DE MATURAÇÃO DO TOMATE NA ANÁLISE DE
AGROTÓXICOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S725i
2012

Sousa, Flaviane Aparecida de, 1982-

Influência do pH, dos constituintes da matriz e do estágio de maturação do tomate na análise de agrotóxicos por cromatografia gasosa / Flaviane Aparecida de Sousa. – Viçosa, MG, 2012.
xvi, 72f. : il. ; (algumas color.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Antônio Augusto Neves.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Cromatografia a gás. 2. Pesticidas - Análise. 3. Produtos químicos agrícolas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 543.85

FLAVIANE APARECIDA DE SOUSA

**INFLUÊNCIA DO pH, DOS CONSTITUINTES DA MATRIZ E DO
ESTÁDIO DE MATURAÇÃO DO TOMATE NA ANÁLISE DE
AGROTÓXICOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 18 de dezembro de 2012

Prof. Maurício Xavier Coutrim

Prof. José Humberto de Queiroz

Prof. André Fernando de Oliveira

Prof^a. Maria Eliana Lopes Ribeiro de
Queiroz
(Coorientadora)

Prof. Antônio Augusto Neves
(Orientador)

*Aos meus pais Miguel e Maria Aparecida,
com amor dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pelas conquistas que Ele tem me proporcionado.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Química, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

À CAPES-REUNI pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores Antônio Augusto Neves e Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, pela orientação, confiança, incentivo, carinho e amizade dedicados a mim durante a realização deste trabalho.

Aos professores Maurício Xavier Coutrin e José Humberto de Queiroz pela participação na banca de qualificação e pelas sugestões que resultaram neste trabalho.

Aos professores Gevany Paulino de Pinho, Reinaldo Francisco Teófilo e André Fernando de Oliveira pelas valiosas sugestões e parceria.

Ao técnico Ricardo pela disposição em ajudar sempre que necessário.

A todos os colegas do laboratório de química analítica – LAQUA. Em especial às minhas amigas Anna Isabel e Fernanda, pelo carinho, companheirismo e agradável convivência.

Aos meus pais pelo amor e carinho, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Aos meus irmãos Fábio e Flávia e aos meus cunhados Walderio e Adriana pelo incentivo e por acreditarem sempre na minha capacidade. Aos meus sobrinhos Mateus, Vívian, Ana Clara, Ulisses e Maria Luíza por tornarem a minha vida mais feliz.

A todos os meus familiares, por todo carinho e torcida. Ao meu vô Joaquim e à tia Marlene pelas valiosas orações sempre presentes.

E, principalmente ao Robson, meu amor, pela confiança, pela força, por me fazer acreditar que eu era capaz quando eu não me sentia como tal. Sua presença foi muito importante nessa conquista.

A todos aqueles não citados aqui, que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

BIOGRAFIA

FLAVIANE APARECIDA DE SOUSA, filha de Miguel José de Souza e Maria Aparecida de Souza, nasceu em Caratinga, Minas Gerais, em 26 de outubro de 1982.

Em fevereiro de 2002, iniciou o Curso de Graduação em Química, pelo Centro Universitário de Caratinga, diplomando-se em licenciatura em agosto de 2005.

Neste mesmo mês iniciou o curso de Pós Graduação Latu Sensu pelo Centro Universitário de Caratinga, obtendo o título de Especialista em Ensino de Química em setembro de 2006.

Em março de 2007, iniciou o curso de Pós-Graduação em Agroquímica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2009.

Em março deste mesmo ano iniciou o curso de Pós-Graduação em Agroquímica, em nível de doutorado, na Universidade Federal de Viçosa submetendo-se à defesa de tese em dezembro de 2012.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
Introdução Geral.....	1
Capítulo 1 - Avaliação do efeito de matriz na resposta cromatográfica de onze pesticidas por cromatografia gasosa e PCA	3
1.1. Introdução.....	4
1.2. Material e métodos	9
1.2.1.Reagentes.....	9
1.2.2. Instrumentos.....	9
1.2.3. Preparo das amostras.....	10
1.2.4. Análise por CG/DCE.....	11
1.2.5. Avaliação do efeito de matriz.....	11
1.2.6. Análise de componentes principais.....	12
1.2.7. Influência do pH das amostras no efeito de matriz.....	12
1.3. Resultados e discussão.....	13
1.3.1. Análise cromatográfica.....	13
1.3.2. Efeito de matriz.....	14
1.3.3. Análise de componentes principais (PCA).....	17
1.3.4. Influência do pH	23
1.4. Referências bibliográficas.....	26
Capítulo 2 – Influência do pH e dos componentes da matriz na resposta cromatográfica de agrotóxicos.....	29
2.1. Introdução.....	30

2.2. Material e Métodos.....	32
2.2.1. Reagentes.....	32
2.2.2. Instrumentos.....	33
2.2.3. Preparo das amostras.....	33
2.2.4. Análise por CG/DCE.....	34
2.2.5. Efeito de matriz.....	34
2.2.6. Influência do pH no efeito de matriz.....	35
2.2.7. Análises estatísticas.....	35
2.2.8 Análise de componentes principais.....	36
2.3. Resultados e discussão.....	36
2.3.1. Análise cromatográfica.....	36
2.3.2. Avaliação do efeito de matriz.....	37
2.3.3. Influência do pH no efeito de matriz.....	40
2.3.4. Análise de componentes principais.....	42
2.4. Referências bibliográficas.....	44

Capítulo 3 - influência do estágio de maturação do tomate na análise de agrotóxicos por cromatografia gasosa	47
3.1. Introdução.....	48
3.2. Material e Métodos.....	49
3.2.1. Amostras.....	49
3.2.2. Caracterização das amostras de tomate.....	50
3.2.3. Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT).....	51
3.2.4. Quantificação dos caortenoides.....	51
3.2.5. Beta caroteno.....	52
3.2.6. Análise por CG/DCE.....	53
3.2.7. Efeito de matriz.....	54
3.2.8. Análises estatísticas.....	55
3.3. Resultados e discussão.....	56
3.3.1 Quantificação de licopeno e beta caroteno nos extratos orgânicos de tomate.....	56
3.3.2 Caracterização das amostras de	57

tomate.....	
3.3.3. Análise cromatográfica.....	59
3.3.4. Efeito de matriz.....	60
3.5. Referências bibliográficas.....	65
Consideração final.....	68
Perspectivas futuras.....	69
ANEXOS	70
ANEXO A	71

LISTA DE TABELAS

	Tabela	Pág
Tabela 1.1.	Propriedades físicas e químicas dos compostos estudados neste trabalho.	7
Tabela 1.2.	Condições de preparo dos extratos orgânicos das matrizes por ESL-PBT ou ELL-PBT.	10
Tabela 1.3.	Matriz construída para a análise de componentes principais contendo o efeito de matriz (%) para cada agrotóxico na concentração de $100\mu\text{g L}^{-1}$ nas diferentes amostras.	18
Tabela 1.4.	Porcentagem de variância capturada pela PCA para cada concentração.	19
Tabela 1.5.	Valores de pH dos extratos aquosos das amostras.	23
Tabela 2.1.	Condições de preparo dos extratos orgânicos das matrizes por ESL-PBT.	33
Tabela 2.2.	Variáveis e níveis usadas na análise estatística.	35
Tabela 2.3.	Efeito dos componentes de três matrizes na resposta cromatográfica dos agrotóxicos (%), em função do pH dos extratos.	38
Tabela 3.1	Concentrações dos carotenoides na fase orgânica nos estádios de maturação.	57
Tabela 3.2.	Parâmetros de qualidade dos frutos de tomate ao longo da maturação.	58
Tabela 3.3.	Correlação entre o efeito de matriz nos diferentes estádios de maturação e as características físicas e químicas dos tomates	61

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág
Figura 1.1. Cromatograma de uma solução-padrão dos agrotóxicos a 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila, onde: 1.clorotalonil ($t_R = 6,47$), 2.parationa metílica ($t_R = 7,01$), 3.clorpirifós ($t_R = 7,80$), 4.procimidona ($t_R = 8,71$), 5. α -endossulfam ($t_R = 9,23$), 6. β -endossulfam ($t_R = 10,2$), 7.iprodiona ($t_R = 10,39$), 8. λ -cialotrina ($t_R = 13,21$ - $13,44$), 9.permetrina ($t_R = 14,25$ - $14,40$), 10.cipermetrina ($t_R = 15,23$ - $15,39$ - $15,51$), 11.deltametrina ($t_R = 17,4$ - $17,8$), 12. Azoxistrobina ($t_R = 18,4$).	13
Figura 1.2. (A) Cromatograma do extrato orgânico de uva isenta de agrotóxicos obtidos por ESL-PBT. (B) Cromatograma do extrato orgânico de uva obtido por ESL-PBT e fortificado com os agrotóxicos a 300 $\mu\text{g L}^{-1}$, onde: 1.clorotalonil ($t_R = 6,47$), 2.parationa metílica ($t_R = 7,01$), 3.clorpirifós ($t_R = 7,80$), 4.procimidona ($t_R = 8,71$), 5. α -endossulfam ($t_R = 9,23$), 6. β -endossulfam ($t_R = 10,2$), 7.iprodiona ($t_R = 10,39$), 8. λ -cialotrina ($t_R = 13,21$ - $13,44$), 9.permetrina ($t_R = 14,25$ - $14,40$), 10.cipermetrina ($t_R = 15,23$ - $15,39$ - $15,51$), 11.deltametrina ($t_R = 17,4$ - $17,8$), 12. Azoxistrobina ($t_R = 18,4$).	15
Figura 1.3. Efeito de coextrativos nas curvas analíticas de agrotóxicos (a) deltametrina em acetonitrila e em extrato orgânico de tomate (b) iprodiona em acetonitrila e em extrato orgânico de batata (c) clorotalonil em acetonitrila e em extrato orgânico de maçã.	16
Figura 1.4. Efeito de matriz, em porcentagem, do clorotalonil em diferentes concentrações para sete amostras diferentes.	17
Figura 1.5. PCA usando o biplot para efeito de matriz de sete diferentes matrizes - <i>loadings</i> ($\square$) onze agrotóxicos -	20

scores (○) em cinco concentrações (A) 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, (B) 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ (C) 300 $\mu\text{g L}^{-1}$, (D) 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ e (E) 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

- Figura 1.6. Efeito de matriz para as matrizes solo (A), batata (B), 21
água (C), maçã (D), abacaxi (E), uva (F) e tomate (G).
Agrotóxicos são: 1-clorotalonil, 2-parationa-metílica,
3-clorpirifós, 4-procimidona, 5-endossulfam, 6-iprodiona,
7-cialotrina, 8-permetrina, 9-cipermetrina, 10-deltametrina,
11-azoxistrobina. Barras escuras são em menores
concentrações e barras claras altas concentrações.
- Figura 1.7. Comparação do efeito dos componentes das matrizes 24
tomate, abacaxi e uva e da água com valores de pH
ajustados para o pH dessas matrizes para o agrotóxico λ -
cialotrina.
- Figura 1.8. Espectros de absorção dos extratos orgânicos de tomate, 25
abacaxi e uva preparados com água destilada e com
solução de Na_2HPO_4 0,2 mol L^{-1} .
- Figura 2.1. Cromatograma obtido da análise dos nove agrotóxicos em 37
acetonitrila na concentração 300 $\mu\text{g L}^{-1}$, onde: 1-
clorotalonil ($t_R = 4,71$), 2 – parationa metílica ($t_R = 5,04$), 3
– clorpirifós ($t_R = 5,71$), 4 – procimidona ($t_R = 6,35$), 5- α -
endossulfam, β -endossulfam ($t_R = 6,57$ - $7,31$), 6 – λ -
cialotrina ($t_R = 9,48$ - $9,7$), 7 – permetrina ($t_R = 10,44$ - $10,56$),
8 – cipermetrina ($t_R = 11,42$ - $11,53$ - $11,71$), 9 – deltametrina
($t_R = 12,98$ - $13,2$).
- Figura 2.2. Médias marginais do efeito de matriz (eixo y) observado 39
na análise de agrotóxicos em função das matrizes. Onde:
maçã (Δ); batata ($\bullet$) e solo ($\blacklozenge$). Abreviações: Clorot:
clorotalonil; Parat: parationa metílica; Clorp: clorpirifós;
Proc: procimidona; Endos: endossulfam; Cialo: λ -
cialotrina; Perm: permetrina; Ciper: cipermetrina; Delta:
deltametrina.
- Figura 2.3. Médias marginais do efeito de matriz observado na 40
análise de agrotóxicos em extratos orgânicos obtidos pela

ESL-PBT de batata, maçã e solo.

- Figura 2.4. Médias marginais do efeito de matriz (eixo y) em função da interação entre as matrizes e os valores de pH (eixo x). Onde: maçã (■) ; batata (●) e solo (Δ). 41
- Figura 2.5. Resultados da PCA: **(A)** scores da resposta cromatográfica de nove agrotóxicos em diferentes pH. (■) agrotóxicos em pH 3,6 e (●) agrotóxicos em pH 6,0. **(B)** loadings das variáveis batata, maçã e solo (○). 42
- Figura 3.1. Espectros de absorção de solução padrão de licopeno e β-caroteno na concentração de 1,0 mg L⁻¹. 56
- Figura 3.2. Cromatograma de uma solução padrão dos agrotóxicos em acetonitrila (A) e em extrato orgânico de tomate (B) na concentração de 100 μg L⁻¹, onde: 1 – clorotalonil (t_R = 4,51) , 2- clorpirifós (t_R = 5,26), 3 – iprodiona (t_R = 6,44), 4 – permetrina (t_R = 8,14-8,23), 5 – deltametrina (t_R = 9,52-9,71). 59
- Figura 3.3. Efeitos de matriz para os agrotóxicos a 100 μg L⁻¹ nos diferentes estádios de maturação, onde: verde rosado (1), rosa esverdeado (2), róseo (3), vermelho claro (4), vermelho (5). (A) clorpirifós e clorotalonil; (B) iprodiona e permetrina; (C) deltametrina. 60
- Figura 3.4. Resultados da PCA: (A) scores das respostas cromatográficas de cinco agrotóxicos em três concentrações em diferentes matrizes (B) loadings das variáveis licopeno, β-caroteno e mistura dos dois carotenoides. Abreviações: permet: permetrina; iprod: iprodiona; cloro: clorotalonil; clorpir: clorpirifós; deltamet: deltametrina; lico: licopeno; caro: β-caroteno; LC: mistura de licopeno e β-caroteno. 62
- Figura 3.5. Resultados da PCA: (A) scores das respostas cromatográficas de cinco agrotóxicos na concentração de 100 μg L⁻¹ em diferentes matrizes (B) loadings das variáveis licopeno, β-caroteno, mistura dos dois 63

carotenoides, batata, maçã e solo. Abreviações: lico: licopeno; caro: β -caroteno; LC: mistura de licopeno e β -caroteno.

RESUMO

SOUSA, Flaviane Aparecida de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2012. **Influência do pH, dos constituintes da matriz e do estágio de maturação do tomate na análise de agrotóxicos por cromatografia gasosa.** Orientador: Antônio Augusto Neves. Coorientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.

O presente trabalho teve como objetivo aprofundar os estudos relacionados ao efeito de matriz na análise cromatográfica de agrotóxicos. Inicialmente procurou-se avaliar a diferença da resposta cromatográfica de onze analitos (clorotalonil, clorpirifós, parationa metílica, procimidona, endossulfam, iprodiona, permetrina, λ -cialotrina, cipermetrina, deltametrina e azoxistrobina) quando preparados em solvente puro e em extratos orgânicos obtidos por extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) ou extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) de sete matrizes (tomate, abacaxi, uva, água, batata, maçã e solo). A Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada para avaliar os resultados obtidos e resultaram no agrupamento de matrizes: abacaxi, tomate e uva (um grupo), batata, maçã e solo (outro grupo). As matrizes tomate, abacaxi e uva provocaram efeitos de matriz positivos na maioria dos agrotóxicos e as matrizes batata, maçã e solo provocaram uma diminuição na resposta dos agrotóxicos. Analisando os resultados observou-se uma característica comum das matrizes que se agruparam pela PCA: os valores de pH das matrizes tomate, abacaxi e uva são em torno de 4,0. Já os extratos aquosos das matrizes batata, maçã e solo possuem pH mais elevado, em torno de 6,0. Amostras de água destilada tiveram seus valores de pH ajustados com solução de ácido acético glacial para valores idênticos aos das matrizes mais ácidas: uva, abacaxi e tomate. Observou-se que a acidificação da água promoveu uma redução na resposta cromatográfica dos agrotóxicos semelhante aos resultados encontrados para as amostras de água pura. Os resultados demonstraram que o pH das amostras não influencia nas propriedades dos agrotóxicos na fase orgânica, e assim o pH não é, diretamente, o fator responsável pelo maior efeito de matriz verificado para as amostras mais ácidas. No entanto observou-se que os extratos orgânicos das matrizes mais ácidas, quando obtidos com solução alcalina de Na_2HPO_4 (pH próximo de 7,0) apresentavam

coloração menos intensa, indicando que o pH estava relacionado com a extração de coextrativos para a fase orgânica. Numa etapa seguinte avaliou-se a influência do pH das amostras na resposta cromatográfica de nove agrotóxicos (clorotalonil, clorpirifós, parationa metílica, procimidona, endossulfam, iprodiona, permetrina, λ -cialotrina e deltametrina). Nesta etapa foram utilizadas três matrizes (batata, maçã e solo), que tiveram os valores de pH da mistura extratora alterados para verificar a diferença na resposta cromatográfica dos agrotóxicos. Extratos aquosos das matrizes foram obtidos pela ESL-PBT utilizando um determinado volume de água destilada (pH próximo de 6,0) e utilizando-se o mesmo volume de água com o pH alterado para 3,6 com adição de ácido acético glacial. Observou-se que quando o pH da água era alterado para 3,6 mais coextrativos eram extraídos para a fase orgânica, conseqüentemente maior efeito na resposta cromatográfica dos analitos foi observada. A Análise de Componentes Principais mostrou a formação de dois grupos distintos: um formado pelas matrizes contendo água em pH = 6,0 e outro das matrizes com água em pH = 3,6. Finalmente, a influência do estágio de maturação do tomate, que foi uma matriz que provocou efeito significativo na resposta dos agrotóxicos, foi avaliada. Nessa etapa, cinco agrotóxicos pertencentes a diferentes grupos separados pela PCA nas etapas anteriores do trabalho foram selecionados para estudo (permetrina, iprodiona, clorotalonil, clorpirifós e deltametrina). Os resultados mostraram que à medida que o fruto amadurece, maior quantidade de coextrativos é encontrada. Os coextrativos licopeno e β -caroteno influenciam diretamente na resposta cromatográfica dos analitos. Ao analisar a influência desses componentes do tomate juntamente com outras matrizes, observou-se que estes são responsáveis pelo maior efeito de matriz na análise de agrotóxicos, principalmente para o agrotóxico deltametrina.

ABSTRACT

SOUSA, Flaviane Aparecida de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, december, 2012. **Influence of pH, components of the matrix and the stage of maturation of tomato in the analysis of pesticides by gas chromatography.** Adviser: Antônio Augusto Neves. Co-adviser: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.

The present study aimed to deepen the studies related to matrix effect on chromatographic analysis of pesticides. Initially we sought to evaluate the difference in chromatographic response of eleven analytes (chlorothalonil, chlorpyrifos, methyl parathion, procymidone, endosulfan, iprodione, permethrin, λ -cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin and azoxystrobin) when prepared in pure solvent and in organic extracts obtained by solid-liquid extraction with partition at low temperature (SLE-PLT) or liquid-liquid extraction with partition at low temperature (LLE-PLT) of seven matrices (tomato, pineapple, grapes, water, potato, apple and soil). The Principal Component Analysis (PCA) was used to evaluate the results obtained and resulted in the grouping of matrices: pineapple, tomato and grape (a group), potato, apple and soil (another group). The matrices tomato, pineapple and grape caused matrix effects positive in most pesticides and matrices potato, apple and soil caused a decrease in the response of pesticides. Analyzing the results showed a common characteristic of matrices that were grouped by PCA: pH values of the matrices tomato, grape and pineapple are around 4.0. The matrices potato, apple and soil have higher pH, around 6.0. Distilled water samples had their pH values adjusted with glacial acetic acid solution to values identical to matrices most acidic: grape, pineapple and tomato. It was noted that acidification of the water was a decrease in the chromatographic response of the pesticides similar to those results found for samples of pure water. The results demonstrating that the pH of the samples does not influence the properties of the pesticide in the organic phase, and thus the pH is not the factor directly responsible for the largest matrix effect observed for samples more acidic. However it was observed that organic extracts the matrices more acidic when obtained with alkaline solution of Na_2HPO_4 (pH around 7.0) had less intense staining, indicating that pH was related to the extraction of co-extractives into the organic phase. In a next step we evaluated the influence of pH on the chromatographic response of nine pesticides (chlorothalonil, chlorpyrifos, methyl

parathion, procymidone, endosulfan, iprodione, permethrin, deltamethrin and λ -cyhalothrin). At this stage we used three matrices (potato, apple and soil), which had pH values of the extraction mixture changed to investigate differences in the chromatographic response of pesticides. Aqueous extracts were obtained by of the matrices ESL-PBT using a specified volume of distilled water (pH around 6.0) and using the same volume of water with the pH changed to 3.6 with addition of glacial acetic acid. It was observed that when the pH of the water was changed to 3.6 more coextrativos were extracted into the organic phase, therefore most effect on chromatographic response of the analytes was observed. The Principal Component Analysis showed the formation of two distinct groups: one formed by matrices containing water at pH = 6.0 and other matrices with water at pH = 3.6. Ultimately, the influence of maturation stage of tomato, which was a matrix that caused significant effect on the response of pesticides, has been evaluated. At this stage, five insecticides belonging to different groups separated by PCA in the previous stages of the work were selected for study (permethrin, iprodione, chlorothalonil, chlorpyrifos and deltamethrin). The results showed that as the fruit matures, a larger amount to co-extractives is found. The co-extractives lycopene and β -carotene influence directly in the chromatographic response of the analytes. When examining the influence of such components of tomato together with other matrices, it was observed that these are responsible for the largest matrix effect in the analysis of pesticide mainly for the pesticide deltamethrin.

INTRODUÇÃO GERAL

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica amplamente aplicada na análise de resíduos de agrotóxicos. Um erro comum associado a essa análise é o efeito de matriz. Esse efeito é a alteração da resposta cromatográfica dos analitos provocada pelos componentes da matriz. Os coextrativos da matriz, presentes no extrato orgânico, competem com os analitos pelos sítios ativos do insertor, provocando diferença na resposta do analito quando preparado em solvente puro e em extrato da matriz.

Trabalhos realizados no Laboratório de Química Analítica (LAQUA) confirmaram a existência desse efeito na análise de resíduos de agrotóxicos por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons em diversas matrizes, dentre elas amostras ambientais e alimentícias. Com base nesses resultados, um trabalho mais abrangente sobre o efeito de matriz na análise de agrotóxicos por CG-DCE foi realizado.

No primeiro capítulo desse trabalho procurou-se avaliar a diferença da resposta cromatográfica de onze analitos (clorotalonil, clorpirifós, parationa metílica, procimidona, endossulfam, iprodiona, permetrina, λ -cialotrina, cipermetrina, deltametrina e azoxistrobina) quando preparados em solvente puro e em extratos orgânicos obtidos de sete matrizes (tomate, abacaxi, uva, água, batata, maçã e solo). Os resultados obtidos dos efeitos da matriz foram analisados utilizando-se a Análise de Componentes Principais (PCA) e foram publicados no periódico Food Chemistry [1].

A partir da separação das matrizes mostradas pela PCA foi possível avaliar, no segundo capítulo, a influência do pH das amostras na resposta cromatográfica de nove agrotóxicos. Nesta etapa foram utilizadas três matrizes (batata, maçã e solo) que foram agrupadas na primeira parte do trabalho por apresentarem efeitos de matriz semelhantes e por terem seus extratos aquosos com valores de pH próximos. Esses resultados foram aceitos para publicação na revista Chromatographia [2].

Finalmente, a influência do estágio de maturação do tomate, que foi uma matriz que provocou efeito significativo na resposta dos agrotóxicos, foi avaliada. Parâmetros físico-químicos do tomate nos diferentes estádios de maturação e os

teores de carotenoides foram correlacionados com o efeito de matriz. Nessa etapa, cinco agrotóxicos pertencentes a diferentes grupos separados pela PCA nas etapas anteriores do trabalho foram selecionados para estudo.

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ NA RESPOSTA CROMATOGRÁFICA DE ONZE PESTICIDAS POR CROMATOGRAFIA GASOSA E PCA

1.1. Introdução

Em análise cromatográfica de amostras complexas, as respostas atribuídas aos agrotóxicos podem sofrer alterações causadas pelos componentes da matriz. A essas alterações é dado o nome de efeito de matriz. Esse fenômeno é usado para explicar taxas de recuperação de agrotóxicos que excedem 100% e a baixa precisão de resultados [3]. Geralmente o efeito de matriz é observado quando uma considerável diferença na resposta cromatográfica é obtida entre padrões preparados no solvente e aqueles preparados no extrato da matriz [4]. Este efeito pode ser positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal) sobre o resultado da análise. Essas alterações são consequência da adsorção dos analitos e dos componentes da matriz tanto no injetor, no detector e/ou na coluna cromatográfica [5].

Quando soluções-padrão são preparadas em solvente puro e analisadas por cromatografia gasosa, os analitos podem se ligar aos sítios ativos do insertor e uma menor quantidade do mesmo é transferida para a coluna cromatográfica e consequentemente detectada. Na análise do extrato da matriz contendo esses analitos, os coextrativos competem com os analitos pela ocupação dos sítios, fazendo com que uma maior quantidade de analito seja transferida à coluna cromatográfica do que quando preparados em solvente puro. Quando a resposta do detector, atribuída ao analito, é comparada com a resposta de soluções-padrão do mesmo analito em solvente, ocorre uma superestimação dos resultados [6]. Alteração na resposta cromatográfica dos analitos também é observada quando os componentes não voláteis das matrizes podem se acumular no insertor ou na coluna cromatográfica, resultando na formação de novos sítios ativos, aos quais os analitos também se ligam, fazendo com que uma menor quantidade seja transferida à coluna cromatográfica, acarretando na diminuição das respostas quando comparadas às preparadas em solvente puro. Este fato é muitas vezes chamado de indução da diminuição da resposta pela matriz [7].

No sentido de tentar minimizar ou até mesmo eliminar o efeito de matriz, diversos trabalhos têm sido realizados, como por exemplo, a limpeza prévia dos extratos [4]. Esta etapa consiste em remover os componentes endógenos da matriz

para diminuir a contaminação do sistema cromatográfico. Entretanto, a limpeza exaustiva dos extratos reduz também a porcentagem de extração dos analitos, tornando, muitas vezes, o método inviável [8]. A construção da curva analítica no próprio extrato da amostra, livre de resíduos de agrotóxicos também é uma alternativa utilizada para avaliar o efeito de matriz [9; 10; 11; 6]. Nesse caso, os sítios ativos são ocupados da mesma forma tanto na análise dos padrões quanto na análise das amostras, reduzindo o efeito de matriz. O uso de protetores de analitos tem-se apresentado também como uma técnica promissora. Os protetores ocupam os sítios ativos do insertor, de forma a minimizar a adsorção dos analitos de interesse. Assim, ao se realizarem as análises dos padrões e extratos, estas não seriam afetadas pelo efeito de matriz. Esses analitos protetores devem ter volatilidade similar à dos agrotóxicos, impedindo a adsorção destes durante a análise da solução-padrão, assim como ocorre nos extratos. Esses compostos devem apresentar grupos polares, como hidroxilas, carboxilas, grupos nitrogenados, etc., para que, ao competirem com os agrotóxicos, sejam predominantemente adsorvidos no insertor, liberando o analito para a coluna cromatográfica [12; 13].

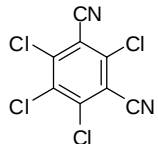
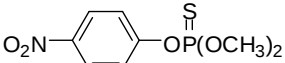
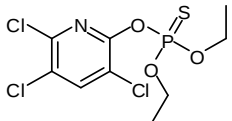
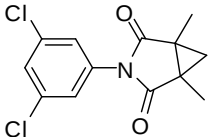
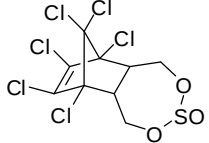
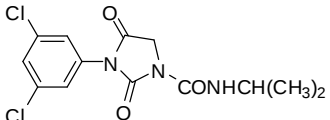
Na literatura, diversos autores têm se dedicado ao estudo do efeito de matriz em análises cromatográficas. Menkissoglu-Spiroudi e Fotopoulou (2004) [10] estudaram o efeito dos componentes de diferentes vegetais na resposta cromatográfica de um grupo de agrotóxicos e observaram porcentagens de recuperação superiores a 200% para alguns pesticidas. Erney *et al.* (1993) abordaram o estudo do efeito de matriz em análises de organofosforados em leite e nata e porcentagens de recuperação elevadas também foram observadas [9]. Jimenez *et al.* (1998) analisou a diferença da resposta cromatográfica para diferentes agrotóxicos em mel, encontrando para o agrotóxico captan porcentagens de recuperação superiores a 1000% [14].

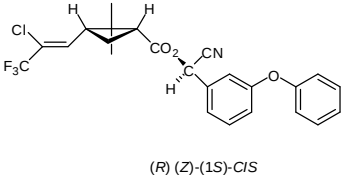
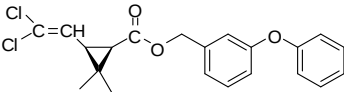
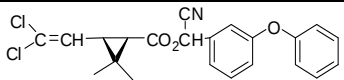
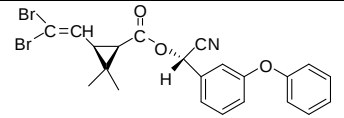
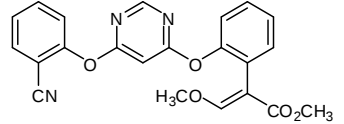
Entretanto, estudos mais abrangentes, que considerem diferentes tipos de matrizes, diferentes compostos e avalie os dados de uma maneira multivariada, são ainda necessários, uma vez que as análises cromatográficas têm se tornado comum em diversas áreas do conhecimento.

Neste sentido, o objetivo desta parte do trabalho foi avaliar o efeito dos coextrativos de sete matrizes diferentes na análise de onze agrotóxicos por cromatografia gasosa

com detector por captura de elétrons e analisar os efeitos de matriz obtidos pela análise de componentes principais (PCA). Na Tabela 1.1 são apresentadas as propriedades de cada um dos compostos que foram analisados.

Tabela 1.1. Propriedades físicas e químicas dos compostos estudados neste trabalho.

Composto	Fórmula	Grupo Químico	Tempo de retenção/min	Massa Molar /g mol ⁻¹	K _{ow} (pH 7,0 e a 20 °C)	Temperatura de Ebulição / °C
Clorotalonil		Isoftalonitrila	6,47	265,91	8,71x10 ²	350,5
Parationa-metílica		Organofosforado	6,99	263,21	1,00x10 ³	334,7
Clorpirifós		Neonicotinóide	7,76	350,89	5,01x10 ⁴	375,9
Procimidona		Dicarboximida	8,70	284,14	2,00x10 ³	477,9
Endossulfam		Clorociclodieno	9,18 / 10,11	406,93	5,62x10 ⁴	449,7
Iprodiona		Dicarboximida	10,4	330,17	1,26x10 ³	—

λ-cialotrina	 (R) (Z)-(1S)-ClS	Piretróide	13,22 / 13,41	449,85	7,94x10 ⁶	498,9
Permetrina		Piretróide	14,19 / 14,31	391,3	1,26x10 ⁶	465,9
Cipermetrina		Piretróide	15,21/ 15,32 /15,45	416,3	1,26x10 ⁶	511,3
Deltametrina		Piretróide	17,37 / 17,75	505,2	2,00x10 ⁵	535,8
Azoxistrobina		Estrobilurina	18,29	403,4	3,16 X 10 ²	581,3

1.2. Material e métodos

1.2.1. Reagentes

Soluções padrão estoque de clorotalonil (99,3% m/m), procimidona (99,9% m/m), iprodiona (99,3% m/m), deltametrina (99,7% m/m), azoxistrobina (99,9% m/m) adquiridos da Sigma Aldrich (Seelze, Alemanha), parationa metílica (99,0% m/m), clorpirifós (99,0% m/m), endossulfam (73,2% m/m), cipermetrina (92,4% m/m) adquiridos da Chem Service (West Chester, PA, USA), λ -cialotrina (86,5% m/m) e permetrina (92,2% m/m) adquiridos da Syngenta (São Paulo, Brasil), foram preparadas em acetonitrila na concentração de 1000 mg L⁻¹ e armazenadas em temperatura de 4 °C. A partir da diluição das soluções estoque, foram preparadas soluções contendo os onze agrotóxicos em concentrações de 10 e 20 mg L⁻¹ no mesmo solvente.

Como solventes foram utilizados acetato de etila para análise de traços e acetonitrila grau HPLC, ambos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Sulfato de sódio anidro com grau de pureza superior a 99% também foi adquirido da Vetec. Florisil para análise de resíduos (0,150-0,250 mm) foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha).

1.2.2. Instrumentos

Foi utilizado um cromatógrafo a gás da Shimadzu (CG-2014) equipado com um detector por captura de elétrons (DCE), auto injetor AOC – 20i e uma coluna capilar HP-5 da Agilent Technologies.

Um banho ultrassônico da Unique (São Paulo, Brasil) foi utilizado no preparo das amostras. O gerador deste banho tem potência de 150 W e uma frequência de 25 kHz. Também foi utilizada uma mesa agitadora (Tecnal TE - 420, São Paulo, Brasil). Um pHmetro Digimed foi usado para ajustar o pH das amostras. Um espectrofotômetro GBC 20, modelo Cintra foi utilizado para análise espectrofotométrica.

1.2.3. Preparo das amostras

Os extratos orgânicos de amostras de tomate, batata, maçã, abacaxi, solo, uva e extratos orgânicos de amostras de água foram obtidos a partir do método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) e extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT), respectivamente.

As condições de obtenção dos extratos orgânicos das diferentes matrizes estão descritas na Tabela 1.2.

Tabela 1.2. Condições de preparo dos extratos orgânicos das matrizes por ESL-PBT ou ELL-PBT

Nº	Matriz	Quant.	Mistura extratora			Homogeneização	Ref
			Acetonitrila	Acetato de etila	Água		
1	Tomate	4,0 g	8,0 mL	1,5 mL	0,5 mL	Ultrassom (10 min)	[15]
2	Batata	3,0 g	6,5 mL	1,5 mL	1,0 mL	Ultrassom (10 min)	[16]
3	Água	4,0 mL	6,5 mL	1,5 mL	-	Mesa agitadora (15 min)	[17]
4	Maçã	3,0 g	6,5 mL	1,5 mL	1,0 mL ^a	Mesa agitadora (30 min)	[16]
5	Solo	1,0 g	6,5 mL	1,5 mL	4,0 mL	Mesa agitadora (30 min)	[16]
6	Abacaxi	3,0 g	7,0 mL	1,5 mL	1,5 mL	Mesa agitadora (10 min)	- ^b
7	Uva	3,0 g	6,5 mL	1,5 mL	1,0 mL	Mesa agitadora (15 min)	- ^b

^aExtratos orgânicos líquidos foram passados por colunas com 2,0 g de florisil e 1,5 de sulfato de sódio. A água foi substituída por 1,0 mL de solução de NaH₂PO₄ 0,2 mol L⁻¹.

^bDados ainda não publicados.

Uma determinada quantidade da amostra foi transferida para um frasco de vidro transparente (22 mL) sendo, em seguida, adicionada mistura extratora composta por acetonitrila, água e acetato de etila. O sistema foi submetido à homogeneização e resfriado em freezer a -20 °C por 6 h. Após este período, foi obtido um sistema bifásico constituído da fase sólida (congelamento da fase aquosa e da matriz) e da fase líquida (sobrenadante). Este líquido foi passado por 1,50 g de sulfato de sódio anidro. O filtrado obtido (extrato) foi recuperado em balão volumétrico de 10,0 mL, sendo o volume ajustado com acetonitrila e a solução foi armazenada em freezer, até o momento da análise por CG/DCE.

1.2.4. Análise por CG/DCE

A separação cromatográfica dos analitos foi realizada em uma coluna capilar HP-5 da Agilent Technologies, com fase estacionária composta de 5% difenil e 95% dimetilsiloxano (30 m × 0,25 mm d.i., 0,1 µm de espessura do filme), sendo nitrogênio (99,999 % de pureza) o gás de arraste a uma vazão de 1,2 mL min⁻¹. As temperaturas do injetor split/splitless e detector foram 280 e 300 °C, respectivamente. A coluna permaneceu inicialmente a 150 °C por 2 min, foi aquecida a 40 °C min⁻¹ até 210 °C, permanecendo nessa temperatura por 2 min e posteriormente aquecida a 20 °C min⁻¹ até 250 °C permanecendo nesta temperatura por 2 min. Finalmente foi aquecida a 10 °C min⁻¹ até 290 °C permanecendo por 7 min nessa temperatura. Foi injetado 1 µL de amostra no cromatógrafo a uma razão de divisor de 1:5. O tempo total de análise foi de 20,5 minutos.

1.2.5. Avaliação do efeito de matriz

Para avaliar a influência dos componentes da matriz na resposta do detector, foram preparadas duas séries de soluções-padrão contendo os onze agrotóxicos nas concentrações entre 10 e 500 µg L⁻¹. A primeira série foi obtida pela diluição da solução de trabalho contendo os agrotóxicos nas concentrações de 10 e 20 mg L⁻¹ em acetonitrila pura (triplicata). A segunda série dos padrões foi preparada pela diluição da mesma solução de trabalho em extratos orgânicos da matriz (triplicata). Os extratos foram obtidos a partir da ESL-PBT para amostras de tomate, batata, maçã, abacaxi, solo e uva isentas de agrotóxicos e ELL-PBT para amostra de água isenta de agrotóxicos. A quantificação dos analitos foi realizada por CG/DCE.

Para avaliar a influência dos coextrativos nas respostas cromatográficas dos agrotóxicos, as áreas obtidas para cada analito em solvente puro foram relacionadas com as áreas obtidas para o mesmo analito em extrato orgânico das matrizes utilizando a Equação 1.1.

$$\text{Efeito de matriz (\%)} = \left(\frac{X_1 - X_2}{X_2} \right) \times 100 \quad (1.1)$$

onde X_1 é a média das áreas atribuídas ao analito preparado em extrato da matriz e X_2 é a média das áreas do analito preparado em solvente puro.

1.2.6. Análise de componentes principais

Uma matriz 7x11 foi construída para o tratamento multivariado dos dados. Os onze agrotóxicos foram definidos como variáveis e, portanto, foram colocados nas colunas. Os sete extratos foram definidos como amostras e, portanto, foram colocados nas linhas. A resposta usada como informação do efeito de matriz foi a porcentagem de variação da resposta cromatográfica do agrotóxico, calculado pela Equação 1.1. Os dados foram importados pelo Software MATLAB 7 (The MathWorks, Inc.) e submetidos aos tratamentos quimiométricos usando o pacote PLS_Toolbox 6.2 (Eigenvector Research, Inc., USA). Os dados das colunas da matriz foram autoescaladas e em seguida a PCA foi executada.

1.2.7. Influência do pH das amostras no efeito de matriz

Amostras de água destilada tiveram seus valores de pH ajustados com solução de ácido acético glacial para valores idênticos aos extratos aquosos das matrizes mais ácidas: uva (3,71), abacaxi (3,64) e tomate (4,32). As amostras de água foram submetidas a ELL-PBT e os extratos orgânicos foram fortificados com os 11 agrotóxicos na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$. As áreas dos picos cromatográficos foram comparadas com as de padrões nas mesmas concentrações em solvente puro e o efeito de matriz calculado (Equação 1.1). O objetivo neste caso foi avaliar a influência do pH na extração dos agrotóxicos para a fase orgânica.

Para verificar a influência do pH na extração de componentes da matriz, extratos orgânicos de tomate, abacaxi e uva foram obtidos conforme descrito na Tabela 1. O mesmo procedimento foi realizado substituindo a água usada na mistura extratora pelo mesmo volume de solução de Na_2HPO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH próximo de 7,0). Os seis extratos orgânicos foram analisados em espectrofotômetro na região do visível (340 a 650 nm).

1.3. Resultados e discussão

1.3.1. Análise cromatográfica

As condições cromatográficas otimizadas para análise simultânea dos onze agrotóxicos permitiram uma boa separação dos compostos conforme pode ser observado no cromatograma apresentado na Figura 1.1.

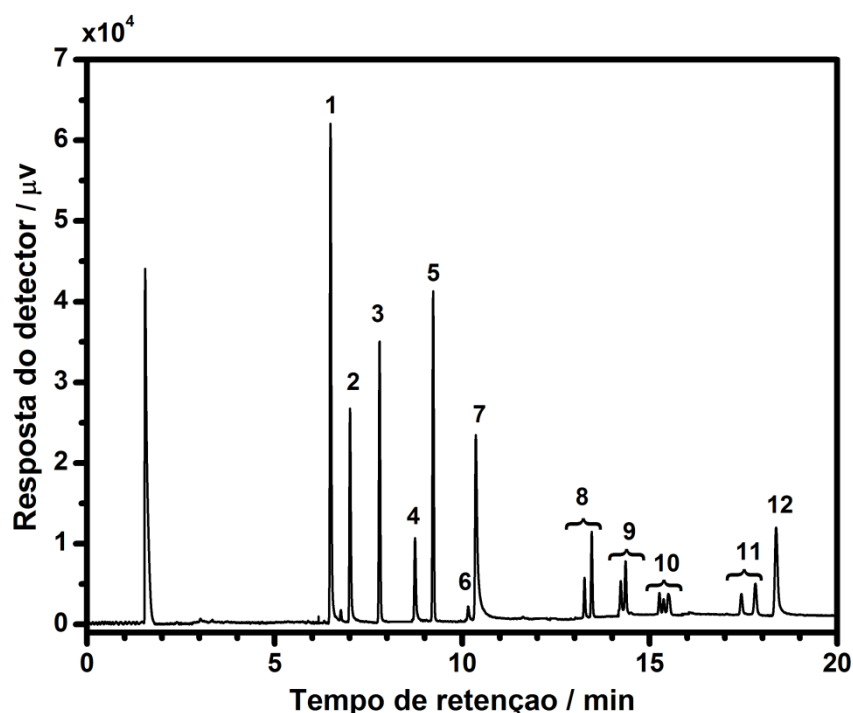


Figura 1.1. Cromatograma de uma solução-padrão dos agrotóxicos a $300 \mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila, onde: 1.clorotalonil ($t_R = 6,47$), 2.parationa metílica ($t_R = 7,01$), 3.clorpirifós ($t_R = 7,80$), 4.procimidona ($t_R = 8,71$), 5. α -endossulfam ($t_R = 9,23$), 6. β -endossulfam ($t_R = 10,2$), 7.iprodiona ($t_R = 10,39$), 8. λ -cialotrina ($t_R = 13,21$ - $13,44$), 9.permetrina ($t_R = 14,25$ - $14,40$), 10.cipermetrina ($t_R = 15,23$ - $15,39$ - $15,51$), 11.deltametrina ($t_R = 17,4$ - $17,8$), 12. Azoxistrobina ($t_R = 18,4$).

A identificação dos compostos nos extratos orgânicos das matrizes foi realizada comparando-se o tempo de retenção (t_R) de cada pico com os tempos de retenção de soluções padrão de analitos em acetonitrila [18]. A quantificação dos compostos endossulfam, λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina, que

possuem mais de um pico, foi realizada somando-se as áreas dos picos referentes aos isômeros de cada um.

Na faixa de concentração utilizada entre 10 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos agrotóxicos em solvente puro, a resposta do detector foi linear com a concentração, apresentando coeficientes de determinação superiores a 0,90.

1.3.2. Efeito de matriz

A presença dos coextrativos nos extratos orgânicos das amostras causa modificações na linha de base dos cromatogramas e as respostas dos agrotóxicos também são alteradas. Entretanto, nenhum interferente no mesmo tempo de retenção dos agrotóxicos foi detectado para todas as matrizes. Na Figura 1.2 é apresentado, como exemplo, o cromatograma dos extratos obtidos de amostras de uva.

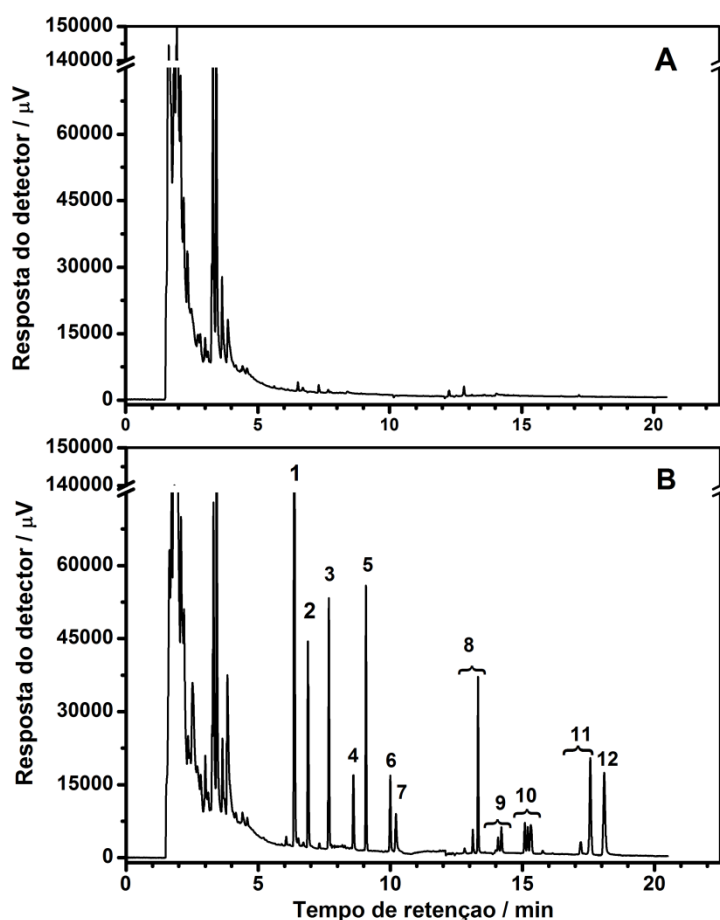


Figura 1.2 . (A) Cromatograma do extrato orgânico de uva isenta de agrotóxicos obtidos por ESL-PBT. (B) Cromatograma do extrato orgânico de uva obtido por ESL-PBT e fortificado com os agrotóxicos a $300 \mu\text{g L}^{-1}$, onde: 1.clorotalonil ($t_R = 6,47$), 2.parationa metílica ($t_R = 7,01$), 3.clorpirifós ($t_R = 7,80$), 4.procimidona ($t_R = 8,71$), 5. α -endossulfam ($t_R = 9,23$), 6. β -endossulfam ($t_R = 10,2$), 7.iprodiona ($t_R = 10,39$), 8. λ -cialotrina ($t_R = 13,21$ - $13,44$), 9.permetrina ($t_R = 14,25$ - $14,40$), 10.cipermetrina ($t_R = 15,23$ - $15,39$ - $15,51$), 11.deltametrina ($t_R = 17,4$ - $17,8$), 12. Azoxistrobina ($t_R = 18,4$).

A interferência dos coextrativos na resposta cromatográfica pode ser evidenciada pelas diferentes características das curvas analíticas de um mesmo agrotóxico em solvente puro e nos extratos obtidos da ESL-PBT. Para cada composto (clorotalonil, parationa metílica, clorpirifós, procimidona, endossulfam, iprodiona, λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina, deltametrina e azoxistrobina) foram obtidas curvas analíticas no solvente puro e nos extratos das matrizes (tomate, batata, água, maçã, solo, abacaxi e uva) na faixa de concentração de 10 a 500

$\mu\text{g L}^{-1}$. A diferença nas inclinações das curvas analíticas (solvente x matriz) é atribuída a um erro sistemático proporcional, provocado pelos componentes da matriz [19; 20]. Esse efeito pode ser positivo quando a inclinação da curva padrão no extrato orgânico é maior que no solvente puro (Figura 1.3a). Pode ser também negativo quando a inclinação da curva padrão no extrato orgânico é menor que da curva padrão no solvente puro (Figura 1.3b). O efeito de matriz pode também ter sua origem em alterações causadas pelos coextrativos, chamada de erro sistemático constante. Isso é identificado quando as inclinações são semelhantes, mas as curvas diferem na intercessão como mostrado na Figura 1.3c.

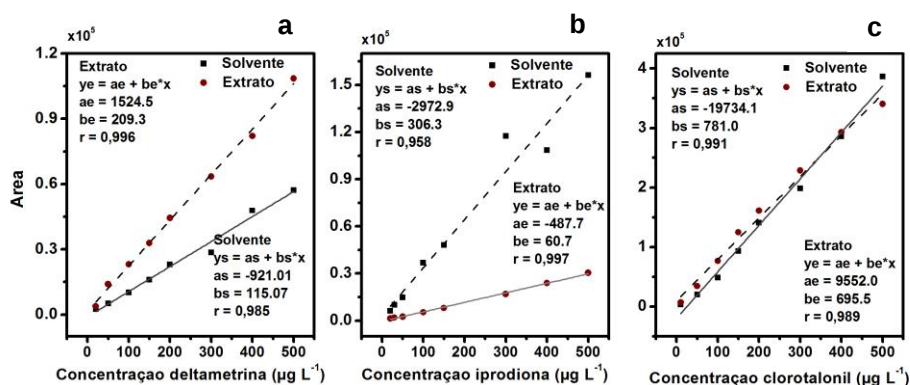


Figura 1.3. Efeito de coextrativos nas curvas analíticas de agrotóxicos (a) deltametrina em acetonitrila e em extrato orgânico de tomate (b) iprodiona em acetonitrila e em extrato orgânico de batata (c) clorotalonil em acetonitrila e em extrato orgânico de maçã.

Na Figura 1.4 estão relacionadas as porcentagens do efeito de matriz para o clorotalonil em diferentes concentrações. O efeito de matriz foi calculado pela relação entre os valores de área do analito no extrato orgânico para cada matriz e em solvente puro (Equação 1.1).

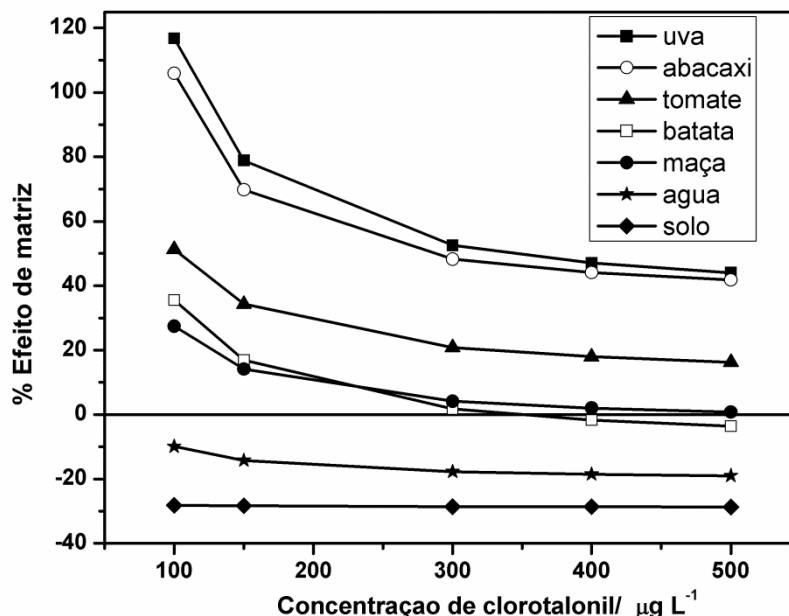


Figura 1.4. Efeito de matriz, em porcentagem, do clorotalonil em diferentes concentrações para sete amostras diferentes.

O efeito de matriz na análise de agrotóxicos é mais significativo em concentrações mais baixas desse composto [3]. Isso ocorre porque, nesse caso, quando injetada uma solução padrão dos agrotóxicos em solvente puro, uma quantidade expressiva do analito é retida na interface do liner e conseqüentemente, pequena quantidade de analito é detectada. Quando se analisam os extratos, os coextrativos das matrizes ocupam os sítios ativos do insertor e apenas uma quantidade insignificante do analito é adsorvida, sendo detectada uma maior quantidade. Observou-se também que para concentrações maiores os valores dos efeitos tendem à igualdade. Resultados semelhantes foram observados para os demais agrotóxicos estudados.

1.3.3. Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais foi realizada com o objetivo de encontrar padrões nas distribuições dos onze agrotóxicos e verificar o efeito das matrizes sobre cada agrotóxico de modo a extrair informações relevantes sobre este sistema.

Os efeitos de matriz calculados usando a Equação 1.1 a partir das áreas atribuídas aos agrotóxicos nos extratos orgânicos foram obtidos nas concentrações de 100, 150, 300, 400 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, ou seja, a avaliação do efeito de matriz foi realizada para cada concentração dos agrotóxicos nos diferentes extratos. Na Tabela 1.3 são apresentados, como exemplo, os dados obtidos apenas para a concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 1.3. Matriz construída para a análise de componentes principais contendo o efeito de matriz (%) para cada agrotóxico na concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ nas diferentes amostras.

	Abacaxi	Uva	Tomate	Batata	Água	Maçã	Solo
Deltametrina	106,7	533,9	112,1	42,6	23,0	55,6	-26,3
Cipermetrina	44,4	188,6	56,3	-62,2	-4,6	27,9	-74,0
λ -cialotrina	69,2	162,8	46,8	-21,4	6,4	21,2	-16,4
Clorotalonil	105,9	116,8	51,3	35,5	-10,0	27,4	-28,2
Azoxistrobina	-6,6	83,6	14,0	10,7	-2,8	5,7	-37,2
Endossulfam	22,3	19,1	18,0	-5,2	-3,2	24,1	-11,6
Parationa metílica	6,5	6,9	7,6	-1,9	-7,2	9,6	-12,9
Clorpirifós	-37,0	-12,2	14,2	-4,0	-4,1	15,1	3,2
Procimidona	-14,1	-17,2	-4,1	-23,6	-9,6	15,1	-12,1
Permetrina	-50,3	-26,4	-4,1	-54,3	-40,6	-23,5	-58,1
Iprodiona	-58,9	-70,8	20,3	-82,2	-69,6	-65,8	-78,5

No ANEXO A estão relacionados, além desses dados, os dados das outras concentrações utilizadas na Análise de Componentes Principais. Os valores positivos correspondem ao aumento da resposta cromatográfica, em porcentagem, observado para um analito em um extrato em relação à resposta em solvente puro. Os valores negativos correspondem à diminuição da resposta cromatográfica para o analito no extrato em relação à resposta no solvente puro.

Na Tabela 1.4 é apresentada a porcentagem de variância explicada pelos diferentes conjuntos de dados para cada componente extraída. Observa-se pela Tabela 1.4 que aproximadamente 90% da variância é capturada com apenas duas componentes para todos os conjuntos, chegando a uma média de 96% de variância

explicada para três componentes. Uma vez que a maior parte da informação se concentrou nas duas primeiras componentes, somente estas duas foram avaliadas.

Tabela 1.4. Porcentagem de variância capturada pela PCA para cada concentração

Concentração/ $\mu\text{g L}^{-1}$	Componente principal	% Variância CP	% Variância cumulativa
100	1	67,35	67,35
	2	22,30	89,65
	3	4,73	94,38
150	1	67,63	67,63
	2	24,37	91,99
	3	4,28	96,27
300	1	67,06	67,06
	2	26,06	93,12
	3	4,24	97,37
400	1	66,75	66,75
	2	26,41	93,15
	3	4,31	97,47
500	1	66,52	66,52
	2	26,59	93,11
	3	4,38	97,49

Para visualizar os dados multidimensionais em duas ou três dimensões, as componentes principais (*scores ou loadings*) são plotadas entre si. Em alguns casos é mais conveniente analisar os *scores* e *loadings* usando um gráfico *biplot*, em que as duas variáveis são plotadas em um mesmo gráfico. Isso facilita a interpretação de qual variável é responsável pela diferença observada na análise das amostras. A Figura 1.5 mostra os gráficos da PCA para as duas primeiras componentes, nas cinco concentrações estudadas.

Uma análise dos *scores* indica que a distribuição dos agrotóxicos não relaciona estreitamente com as suas propriedades físico-químicas, tais como tempo de retenção, temperatura de ebulição ou massa molar com a intensidade do efeito de matriz. Observa-se, no entanto, que algumas matrizes (uva, abacaxi e tomate) sistematicamente causam um efeito de matriz positivo. Outras matrizes como solo, água e batata mostram predominantemente efeito de matriz negativo.

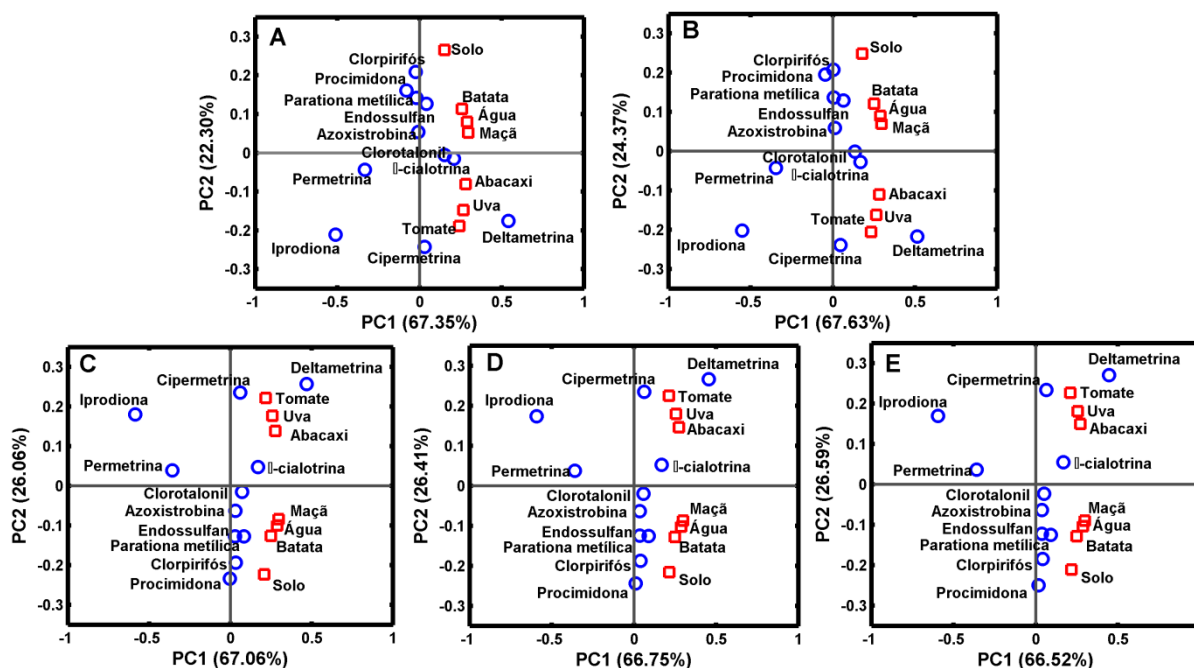


Figura 1.5. PCA usando o biplot para efeito de matriz de sete diferentes matrizes - *loadings* (□) onze agrotóxicos – *scores* (○) em cinco concentrações (A) 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, (B) 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ (C) 300 $\mu\text{g L}^{-1}$, (D) 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ e (E) 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Ao analisar os gráficos *biplot* e observando os *scores* (○) e os *loadings* (□) nota-se, na Figura 1.5, que os agrupamentos dos agrotóxicos e a influência das matrizes apresentaram o mesmo comportamento quando se variou a concentração dos pesticidas. As inversões dos gráficos C, D e E na Figura 1.5 em relação aos gráficos A e B, ocorreram devido às inversões de efeito (negativo para positivo ou o inverso) quando a concentração de alguns agrotóxicos aumentou. A partir de uma análise dos *scores*, observa-se que a primeira componente separa os agrotóxicos deltametrina, permetrina e iprodiona dos demais agrotóxicos. A segunda componente separa os agrotóxicos deltametrina, cipermetrina, λ -cialotrina, permetrina e iprodiona dos demais pesticidas. Ao analisar os *loadings* observa-se que a matriz solo foi a única que mais se destacou das demais. Resultados semelhantes foram encontrados por Pinho *et al.* (2010) [16]. Observa-se também que as matrizes abacaxi, tomate e uva se separaram das demais matrizes pela segunda componente.

Essa separação se deve ao fato de maiores porcentagens de efeito de matriz serem obtidas para esse grupo de matrizes (tomate, abacaxi e uva), sendo a acidez

acentuada a característica comum dessas matrizes e que as distingue das demais. A matriz solo é rica em matéria orgânica, apresentando em sua constituição compostos de alto peso molecular que certamente formam novos sítios ativos no *liner* aos quais os analitos podem se ligar, provocando um efeito de matriz negativo para todos os agrotóxicos e por isso é bem separada das outras matrizes.

Uma segunda interpretação dos gráficos biplot pode ser realizada com o auxílio da Figura 1.6.

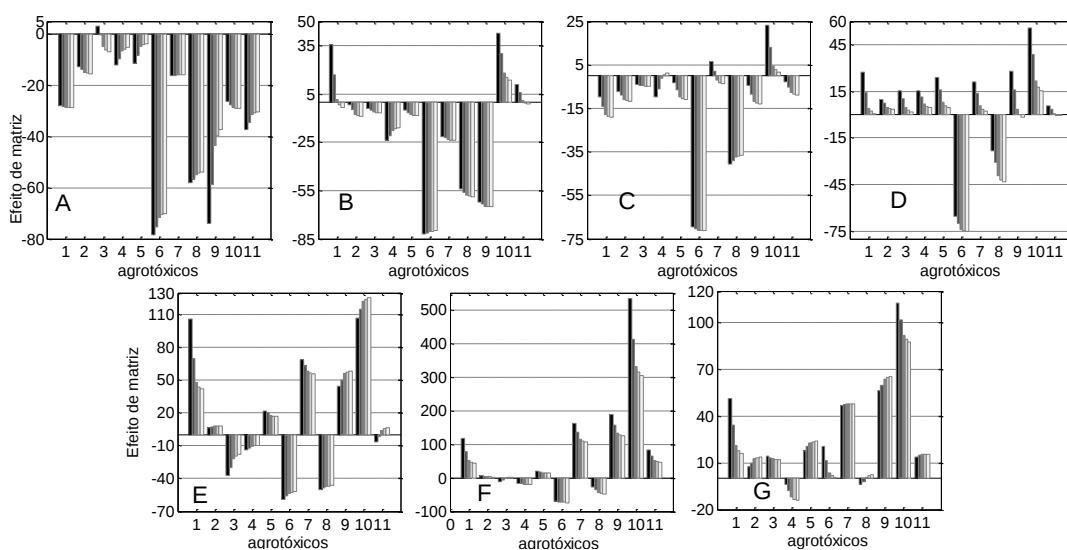


Figura 1.6. Efeito de matriz para as matrizes solo (A), batata (B), água (C), maçã (D), abacaxi (E), uva (F) e tomate (G). Agrotóxicos são: 1-clorotalonil, 2-parationa-metílico, 3-clorpirifós, 4-procimidona, 5-endossulfam, 6-iprodiona, 7-cialotrina, 8-permetrina, 9-cipermetrina, 10-deltametrina, 11-azoxistrobina. Barras escuras são em menores concentrações e barras claras altas concentrações.

Essa figura representa graficamente o efeito de matriz para as diferentes amostras (gráficos A-G), sobre os pesticidas (eixo x) em diferentes concentrações (barras verticais).

Observando as Figuras 1.5 e 1.6 pode-se analisar mais completamente os diferentes sistemas. Para os agrotóxicos clorotalonil e azoxistrobina um comportamento muito semelhante foi observado. Nota-se que a maioria das matrizes provocaram efeitos positivos nestes pesticidas, exceto solo e água. A matriz batata provocou um efeito negativo sobre estes pesticidas quando em altas concentrações.

Nas matrizes abacaxi e tomate o efeito sobre a resposta cromatográfica do clorotalonil foi maior quando em baixas concentrações. No gráfico *biplot*, o clorotalonil e azoxistrobina se localizaram ao centro, por terem sofrido efeitos de matriz positivos e negativos.

Os pesticidas procimidona, clorpirifós, endossulfan, parationa metílica, foram os pesticidas que foram menos afetados pelos componentes da matriz. Nota-se ainda que o efeito sobre os pesticidas procimidona e clorpirifós foram mais negativos, porém ambos sofreram efeitos positivos no extrato de maçã e o clorpirifós, no extrato de tomate. Estes comportamentos fizeram com que estes pesticidas se localizassem no quadrante das matrizes que mais apresentaram efeitos negativos, i.e., solo, batata, água e maçã. O efeito sobre a resposta destes agrotóxicos foi negativo ou positivo, porém como ambos foram baixos, estes pesticidas ficaram mais próximos ao centro no gráfico *biplot*.

A λ -cialotrina sofreu efeitos positivos significativos do abacaxi, uva e tomate. A maçã e a água pouco influenciaram e a batata e o solo tiveram efeito negativo sobre este pesticida. Fica claro, portanto, o motivo da λ -cialotrina ter ficado, no gráfico *biplot*, ao lado das matrizes que mais apresentaram efeitos positivos, i.e., abacaxi, uva e tomate.

Os pesticidas cipermetrina e deltametrina sofreram maiores influências dos componentes das matrizes abacaxi, tomate e uva, fato que fez com que estes ficassem situados no mesmo quadrante dessas matrizes, como mostrado na Figura 1.5. A deltametrina porém, apresentou efeito de matriz positivo maior que a cipermetrina para as matrizes maçã, abacaxi, uva e tomate. A cipermetrina apresentou efeito de matriz negativo para as matrizes batata e água, enquanto que a deltametrina, para essas matrizes, apresentou efeito positivo. Esse fato fez com que a cipermetrina se localizasse mais próxima ao centro do gráfico *biplot* e a deltametrina mais próxima às matrizes tomate, abacaxi e uva. É importante destacar que o comportamento da deltametrina para as matrizes batata, água, maçã, uva e tomate foi mais significativo em menores concentrações do analito.

Já os pesticidas iprodiona e permetrina sofreram efeitos de matriz negativos para todas as matrizes, com exceção do tomate. Os efeitos de matriz negativos sofridos foram muito significativos, justificando dessa forma a posição no gráfico

biplot no mesmo quadrante que as matrizes tomate, abacaxi e uva quando se analisa a segunda componente.

1.3.4. Influência do pH

De acordo com os resultados obtidos na PCA, percebe-se que as matrizes que provocaram um aumento na resposta cromatográfica para a maioria dos agrotóxicos foram o tomate, abacaxi e uva, que são matrizes ácidas. Isto sugere que o pH é uma variável que merece ser estudada em relação aos seus efeitos. Assim, para verificar a influência do pH no efeito de matriz, os extratos aquosos das matrizes estudadas tiveram o pH determinado (Tabela 1.5).

Tabela 1.5. Valores de pH dos extratos aquosos das amostras

Matriz	Tomate	Batata	Água	Maçã	Solo	Abacaxi	Uva
pH	4,32	5,74	6,65	6,73	6,76	3,64	3,71

Com o objetivo de avaliar a influência do pH no comportamento dos agrotóxicos na fase orgânica, amostras de água destilada com pH 6,65 tiveram o pH ajustado com ácido acético para os valores de pH das matrizes mais ácidas: 4,32 (pH tomate), 3,64 (pH abacaxi) e 3,71 (pH uva) e submetidas à ELL-PBT. Além disso, extratos orgânicos de tomate, abacaxi e uva foram obtidos pela ESL-PBT conforme descrito na Tabela 1.1. Soluções padrão dos agrotóxicos foram preparadas numa concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ nesses seis extratos e em solvente puro e analisados por CG-DCE. As porcentagens de variação da resposta cromatográfica para o agrotóxico λ -cialotrina são apresentadas na Figura 1.7. Observou-se que a acidificação da água promoveu uma redução na resposta cromatográfica dos agrotóxicos semelhante aos resultados encontrados para as amostras de água pura. Esse comportamento foi observado também para os demais agrotóxicos estudados. Dessa forma, o pH das amostras não influencia nas propriedades dos agrotóxicos na fase orgânica, e assim o pH não é, diretamente, o fator responsável pelo maior efeito de matriz verificado para as amostras mais ácidas.

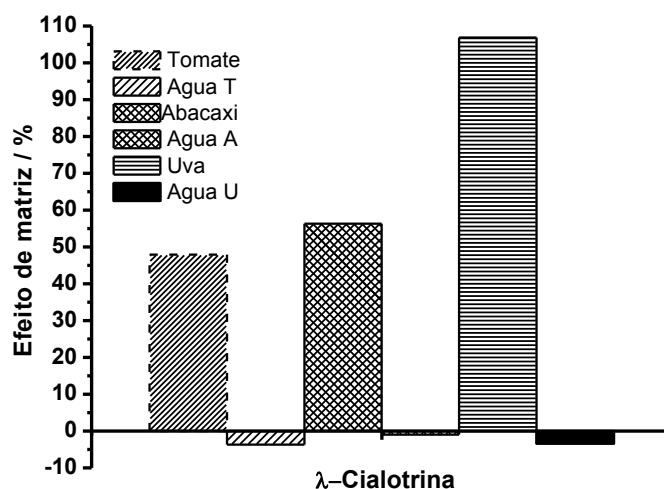


Figura 1.7. Comparação do efeito dos componentes das matrizes tomate, abacaxi e uva e da água com pH ajustados para o pH dessas matrizes para o agrotóxico λ -cialotrina.

Por outro lado, o aumento do pH da mistura extratora causado pelo uso da solução de Na_2HPO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ substituindo a água utilizada na técnica de ESL-PBT para as amostras de tomate, abacaxi e uva, afetou a extração de componentes da matriz. Na Figura 1.8 estão representados os espectros de absorção dos extratos orgânicos das três matrizes em dois valores de pH. Os espectros têm as mesmas características, mostrando apenas que os extratos orgânicos dessas amostras utilizando água pura na mistura extratora ($< \text{pH}$) têm maior absorbância.

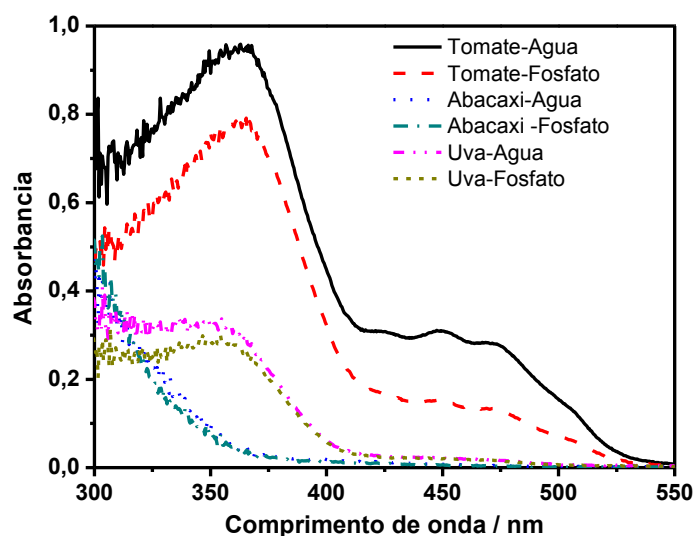


Figura 1.8. Espectros de absorção dos extratos orgânicos de tomate, abacaxi e uva preparados com água destilada e com solução de Na_2HPO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$.

Para amostras de tomate, os extratos orgânicos apresentaram coloração mais intensa e a extração desses coextrativos é afetada de forma significativa pelo pH. Para os extratos orgânicos de uva o mesmo comportamento é observado, porém há uma menor variação de absorbância em função do pH, visto que este extrato possui uma coloração mais clara que o extrato de tomate. Já para os extratos de abacaxi essa diferença é muito pequena, pois o extrato obtido é bem límpido.

Com os resultados deste trabalho podemos inferir que o pH influencia na extração dos coextrativos das amostras, mostrando que as matrizes abacaxi, tomate e uva que possuem valores de pH baixo, apresentaram maiores efeitos de matriz.

1.4. Referências bibliográficas

1. Sousa, F. A.; Costa, A. I. G.; Queiroz, M. E. L. R.; Teófilo, R. F.; Neves, A. A.; Pinho, G. P. Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA. **Food Chemistry**, v. 135, p. 179-185. 2012.
2. Sousa, F. A.; Costa, A. I. G.; Queiroz, M. E. L. R.; Teófilo, R. F.; Pinho, G. P.; Neves, A. A. Influence of pH and Matrix Components in the Chromatographic Response of Pesticides. **Chromatographia**, v., p. 1-7. 2012.
3. Hajslová, J.; Holadová, K.; Kocourek, V.; Poustka, J.; Godula, M.; Cuhra, P.; Kempný, M. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 800, n.2, p. 283-295. 1998.
4. Picó, Y.; Blasco, C.; Font, G. Environmental and food applications of LC–tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: An overview. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 23, n.1, p. 45-85. 2004.
5. Hajslová, J.; Zrostlíková, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n.1-2, p. 181-197. 2003.
6. Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, p. 987-995. 2009.
7. Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J. L.; Fernández Moreno, J. L.; Romero-González, R. Compensation for matrix effects in gas chromatography-tandem mass spectrometry using a single point standard addition. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n.23, p. 4798-4808. 2009.
8. Schenck, F. J.; Lehotay, S. J. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food. **Journal of Chromatography A**, v. 868, n.1, p. 51-61. 2000.
9. Erney, D. R.; Gillespie, A. M.; Gilvydis, D. M.; Poole, C. F. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-

column injection and flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 638, n.1, p. 57-63. 1993.

10. Menkissoglu-Spiroudi, U.; Fotopoulou, A. Matrix effect in gas chromatographic determination of insecticides and fungicides in vegetables. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 84, n.1-3, p. 15-27. 2004.

11. Dömötörövá, M.; Kirchner, M.; Matisová, E.; De Zeeuw, J. Possibilities and limitations of fast GC with narrow-bore columns. **Journal of Separation Science**, v. 29, n.8, p. 1051-1063. 2006.

12. González-Rodríguez, R. M.; Rial-Otero, R.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J. Determination of 23 pesticide residues in leafy vegetables using gas chromatography-ion trap mass spectrometry and analyte protectants. **Journal of Chromatography A**, v. 1196-1197, p. 100-109. 2008.

13. Kirchner, M.; Húsková, R.; Matisová, E.; Mocák, J. Fast gas chromatography for pesticide residues analysis using analyte protectants. **Journal of Chromatography A**, v. 1186, n.1-2, p. 271-280. 2008.

14. Jimenez, J. J.; Bernal, J. L.; Del Nozal, M. J.; Toribio, L.; Martín, M. T. Gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection in the analysis of pesticides in honey after elution from a Florisil column: Influence of the honey matrix on the quantitative results. **Journal of Chromatography A**, v. 823, n.1-2, p. 381-387. 1998.

15. Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O. Pesticide determination in tomatoes by solid-liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 121, n.1, p. 251-256. 2010.

16. Pinho, G. P.; Silvério, F. O.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Starling, M. A. V. M. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatografia de agrotóxicos. **Química Nova**, v. 33, p. 909-913. 2010.

17. Vieira, H. P.; Neves, A. N. A.; Queiroz, M. E. L. R. D. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, p. 535-540. 2007.

18. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: editora da UNICAMP, 2006. 456 p.

19. Cuadros-Rodríguez, L.; Gámiz-Gracia, L.; Almansa-López, E. M.; Bosque-Sendra, J. M. Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n.11, p. 620-636. 2001.
20. Cuadros-Rodríguez, L.; García-Campaña, A. M.; Almansa-López, E.; Egea-González, F. J.; Lourdes Castro Cano, M.; Garrido Frenich, A.; Martínez-Vidal, J. L. Correction function on biased results due to matrix effects: Application to the routine analysis of pesticide residues. **Analytica Chimica Acta**, v. 478, n.2, p. 281-301. 2003.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DO pH E DOS COMPONENTES DA MATRIZ NA RESPOSTA CROMATOGRÁFICA DE AGROTÓXICOS

2.1. Introdução

A cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com diferentes tipos de detectores são amplamente utilizadas para análise de resíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes. Essas técnicas permitem identificar e quantificar agrotóxicos em quantidades inferiores aos limites máximos de resíduos estabelecidos por agências nacionais e internacionais, além de possibilitar a análise de diversos compostos simultaneamente [1].

Alterações da resposta cromatográfica causadas pelos componentes da matriz podem ser observadas na análise de resíduos de agrotóxicos em matrizes complexas por cromatografia gasosa. A essas alterações é dado o nome de efeito de matriz [2]. Esse efeito é observado quando uma considerável diferença na resposta cromatográfica (aumento ou diminuição da resposta) é obtida entre padrões preparados no solvente e aqueles preparados no extrato da matriz [3]. O efeito de matriz é mais pronunciado em análises de amostras complexas, como frutas, vegetais, sucos, vinhos, óleo de oliva, tecidos animais, solos, etc [4].

O efeito de matriz em análises por CG pode ocorrer em diversas partes do sistema cromatográfico como: injetor, coluna ou detector [5; 6; 7]. No injetor, as interações entre analitos e os sítios ativos do *liner* (insertor) são as principais responsáveis pelo efeito de matriz nas análises cromatográficas. As alterações nas respostas podem ser consequência da competição entre os analitos e os componentes da matriz por sítios ativos do sistema cromatográfico [8]. O *liner*, situado na porta de injeção é um tubo de vidro, podendo conter grupos silanois em sua estrutura. Esses grupos silanois são os sítios ativos que podem induzir a degradação ou simplesmente adsorver o composto de interesse. Quando a mudança na resposta cromatográfica for acima de 10% considera-se que o efeito de matriz começa a exercer influência nas análises [9].

Os compostos mais afetados pelo efeito de matriz geralmente são termicamente instáveis e são degradados no sistema cromatográfico quando preparado em solvente puro. Entretanto, quando estes analitos estão presentes nos extratos, componentes das matrizes podem funcionar como protetores,

adsorvendo preferencialmente nos sítios ativos do CG, aumentando a resposta cromatográfica dos analitos [4]. As taxas de recuperação aparentemente mais altas e com baixa precisão são observadas em análises de agrotóxicos mais polares, sendo o grau de polaridade classificado de acordo com a solubilidade em água ou K_{ow} (coeficiente de partição octanol/água) [10]. Agrotóxicos com grupos -P=O (organofosforados), -O-CO-NH- (carbamatos), -OH (hidroxilados), -N= (imidazoles e benzimidazoles), -NH-CO-NH- (derivados da uréia) tendem a sofrer maior efeito de matriz. Os piretroides, apesar de serem menos polares, apresentam efeito de matriz significativo. Neste caso, a elevada massa molar destes compostos dificulta a volatilização fazendo com que menor quantidade do analito seja introduzida na coluna cromatográfica quando preparado em solvente puro, produzindo menores respostas [11].

O efeito de matriz é influenciado não só pelas características físico-químicas dos agrotóxicos, mas também pela natureza da amostra e pelo tipo de coextrativos que ainda permanecem na fase orgânica (tamanho das moléculas, polaridade, estabilidade térmica, volatilidade, etc [2]). Coextrativos como lipídios, alguns pigmentos (clorofila, carotenoides, etc.) e outros componentes de massa molar elevada (resina de plantas) também podem permanecer solubilizados nos extratos, mesmo após o *clean up* da amostra, promovendo o efeito de matriz nas análises cromatográficas [8]. Estudos realizados na primeira parte deste trabalho mostraram a influência dos constituintes de sete matrizes distintas na resposta cromatográfica de onze agrotóxicos. Observou-se que um mesmo agrotóxico pode apresentar resposta cromatográfica diferente em função dos componentes da matriz. Matrizes como batata, maçã e solo foram agrupadas pela análise de componentes principais por apresentarem efeitos de matriz semelhantes. A característica comum apresentada por essas matrizes está relacionada ao pH elevado dos seus extratos aquosos em relação às outras matrizes analisadas. O pH desses extratos são 5,74, 6,73 e 6,76 para batata, maçã e solo, respectivamente. Observou-se que em pH mais baixo há maior presença de coextrativos provenientes da amostra, sendo observado, conseqüentemente, maior efeito de matriz [12].

Embora vários trabalhos tenham sido desenvolvidos para avaliar o efeito da matriz na análise de agrotóxicos [13; 14; 15], nenhum destes avaliou a

influência do pH dos extratos aquosos dessas matrizes na resposta cromatográfica dos analitos. Como as matrizes batata, maçã e solo apresentam naturalmente pH mais elevado, neste trabalho o objetivo foi avaliar a diferença na resposta cromatográfica de nove agrotóxicos provocada pelos componentes dessas matrizes quando o pH da fase aquosa for reduzido.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Reagentes

Soluções padrão estoque de clorotalonil (99,3% m/m), procimidona (99,9% m/m), deltametrina (99,7% m/m), adquiridos da Sigma Aldrich, (Seelze, Alemanha), parationa metílica (99,0% m/m), clorpirifós (99,0% m/m), endossulfam (73,2% m/m), cipermetrina (92,4% m/m) adquiridos da Chem Service (West Chester, PA, USA), λ -cialotrina (86,5% m/m) e permetrina (92,2% m/m) adquiridos da Syngenta (São Paulo, Brasil), foram preparadas em acetonitrila na concentração de 1000 mg L⁻¹ e armazenadas em temperatura de 4 °C. A partir da diluição das soluções estoque, foram preparadas soluções contendo os nove agrotóxicos em concentrações de 10 mg L⁻¹ no mesmo solvente. Os agrotóxicos procimidona e azoxistrobina, avaliados na primeira parte do trabalho não foram analisados nesta etapa, visto que para as matrizes estudadas nesta parte as respostas dos mesmos não foram satisfatórias.

Acetonitrila e acetato de etila para análise de traços, grau HPLC, ambos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) foram utilizados como solvente. Sulfato de sódio anidro com grau de pureza superior a 99% também foi adquirido da Vetec. Florisil para análise de resíduos (0,150-0,250 mm) foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Ácido acético glacial e solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) foram utilizados para ajustar o pH das amostras.

2.2.2. Instrumentos

No preparo das amostras foi utilizada uma mesa agitadora (Tecnal TE - 420, São Paulo, Brasil), um banho ultrassônico da Unique (São Paulo, Brasil) com uma frequência de 25 kHz e um pHmetro Digimed (São Paulo, Brasil).

Um cromatógrafo a gás (modelo GC-2014, Shimadzu, Kyoto, Japan) equipado com um detector por captura de elétrons (DCE) e auto injetor AOC – 20i foi utilizado nas análises. A separação cromatográfica dos analitos foi realizada em uma coluna capilar HP-5 da Agilent Technologies (Palo Alto, USA) com fase estacionária composta de 5% difenil e 95% dimetilsiloxano (30 m × 0.25 mm d.i., 0,1 µm de espessura do filme).

2.2.3. Preparo das amostras

Os extratos orgânicos de amostras de batata, maçã e solo foram obtidos a partir da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT). O filtrado obtido (extrato) foi recuperado em balão volumétrico de 10,0 mL, seu volume completado com acetonitrila e armazenado no freezer, até o momento da análise por GC-ECD. As condições de obtenção dos extratos orgânicos das matrizes estão descritas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Condições de preparo dos extratos orgânicos das matrizes por ESL-PBT

Nº	Matriz	Quant.	Mistura extratora			Agitação
			Acetonitrila	Acetato de etila	Água	
1	Batata	3,0 g	6,5 mL	1,5 mL	1,0 mL	Ultrassom (10 min)
2	Maçã ^a	3,0 g	6,5 mL	1,5 mL	1,0 mL*	Mesa agitadora (30 min)
3	Solo	1,0 g	6,5 mL	1,5 mL	4,0 mL	Mesa agitadora (30 min)

^aExtratos orgânicos líquidos foram passados por colunas com 2,0 g de florissil e 1,5 g de sulfato de sódio.

*A água foi substituída por 1,0 mL de solução aquosa de NaH₂PO₄ 0,2 mol L⁻¹.

2.2.4. Análise por CG/DCE

As condições ótimas para as análises cromatográficas com detecção por captura de elétrons (CG-DCE) foram: gás de arraste nitrogênio (99,999 % de pureza), a uma vazão de 1,2 mL min⁻¹; coluna inicialmente a 150 °C permanecendo nesta temperatura por 2 min, aquecida a 40 °C min⁻¹ até 210 °C, permanecendo nessa temperatura por 2 min e posteriormente aquecida a 20 °C min⁻¹ até 250 °C permanecendo nesta temperatura por 2 min. Finalmente aquecida a 10 °C min⁻¹ até 290 °C permanecendo por 7 min nessa temperatura. As temperaturas do injetor split/splitless e detector foram 280 e 300 °C, respectivamente. Foi injetado 1 µL de amostra no cromatógrafo a uma razão de split de 1:5. O tempo total de análise foi de 18,5 minutos.

2.2.5. Efeito de matriz

Para avaliar a influência dos componentes da matriz na resposta do detector, foram preparadas curvas analíticas dos nove agrotóxicos nas concentrações 100, 150, 300, 400 e 500 µg L⁻¹ em solvente puro e nos extratos orgânicos das matrizes, obtidos por ESL-PBT. As respostas cromatográficas (área do analito) para cada agrotóxico foram plotadas em um gráfico versus as concentrações dos mesmos. As equações da regressão linear foram $y = a_S x + b_S$, para os padrões preparados em solvente e $y = a_E x + b_E$, para os extratos da matriz.

O efeito de matriz foi determinado a partir do coeficiente angular dos dados de regressão (slope) das duas curvas analíticas: preparadas em extrato da matriz e em solvente puro. A porcentagem desse efeito foi calculada pela Equação 2.1 [3].

$$EM = \left(\frac{a_E}{a_S} - 1 \right) \times 100 \quad (2.1)$$

As curvas analíticas das matrizes foram analisadas em dias diferentes e por isso antes de cada injeção dos analitos preparados nos extratos foram injetados os analitos preparados em solvente.

2.2.6. Influência do pH no efeito de matriz

A avaliação da influência do pH no comportamento dos agrotóxicos e na extração de coextrativos das matrizes foi iniciada na primeira parte deste trabalho (Capítulo 1).

No sentido de avaliar a influência do pH na extração dos coextrativos das matrizes e consequentes alterações nas respostas cromatográficas dos nove agrotóxicos estudados nesta etapa, extratos orgânicos das amostras de batata, solo e maçã foram obtidos por ESL-PBT substituindo o volume de água utilizado no método de extração pelo mesmo volume de água com pH ajustado para o valor de 3,6. Os extratos orgânicos obtidos foram utilizados para preparar curvas analíticas na faixa de 100 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. O efeito de matriz foi calculado pela Equação 2.1 comparando-se as respostas dos analitos quando preparados em solvente puro e nos extratos orgânicos obtidos utilizando água sem ajuste de pH ($\text{pH} \approx 6$). O mesmo cálculo foi feito com os extratos orgânicos obtidos quando se utilizou água com pH igual a 3,6 no processo de extração.

2.2.7. Análises estatísticas

Uma tabela fatorial contendo todas as combinações dos níveis das variáveis pH, matriz e tipo de pesticida foi construída (Tabela 2.2). Um total de 108 experimentos foi realizado. A resposta usada (variável dependente) foi o efeito de matriz para cada experimento calculado de acordo com a Equação 2.1.

Tabela 2.2. Variáveis e níveis usadas na análise estatística

Variáveis			Níveis						
pH	3,6	6							
Matriz	Batata	Maçã	Solo						
Pesticidas	Clorot	Par	Clorp	Proc	End	Cial	Per	Cip	Del

Abreviações: Clorot: clorotalonil; Par: parationa metílica; Clorp: clorpirifós; Proc: procimidona; End: endossulfam; Cial: cialotrina; Per: permetrina; Cip: cipermetrina; Del: deltametrina;.

Os dados da Tabela 2.2 foram importados para o STATISTICA versão 7 (StatSoft, Inc.) e, em seguida, a análise estatística foi realizada. Gráficos foram construídos para visualizar as médias das variáveis dependentes para os subconjuntos de experimentos especificados. Cada marcador da média é acompanhado por um conjunto de barras de erro, que são os intervalos de confiança em torno da média.

2.2.8. Análise de componentes principais

Uma matriz 18×3 foi construída para o tratamento multivariado dos dados. Os nove agrotóxicos foram definidos como amostras e, portanto, foram colocados nas linhas para cada valor de pH. Os três extratos foram definidos como variáveis e, portanto, foram colocados nas colunas. A resposta usada como informação foi o valor da porcentagem de variação da resposta cromatográfica do agrotóxico, calculado pela Equação 2.1. Os dados foram importados pelo Software MATLAB 7 (The MathWorks, Inc.) e submetidos aos tratamentos quimiométricos usando o pacote PLS_Toolbox 6.2 (Eigenvector Research, Inc., USA). As colunas da matriz foram autoescaladas e em seguida a PCA foi executada.

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Análise cromatográfica

Na Figura 2.1 é mostrado um cromatograma representativo da análise por CG-ECD dos nove agrotóxicos em acetonitrila na concentração de 300 $\mu\text{g L}^{-1}$. O tempo de retenção dos picos referentes a cada composto foi utilizado para identificação nos extratos das matrizes [16]. A quantificação dos compostos que possuem mais de um pico, foi realizada somando-se as áreas dos picos referentes aos isômeros de cada um.

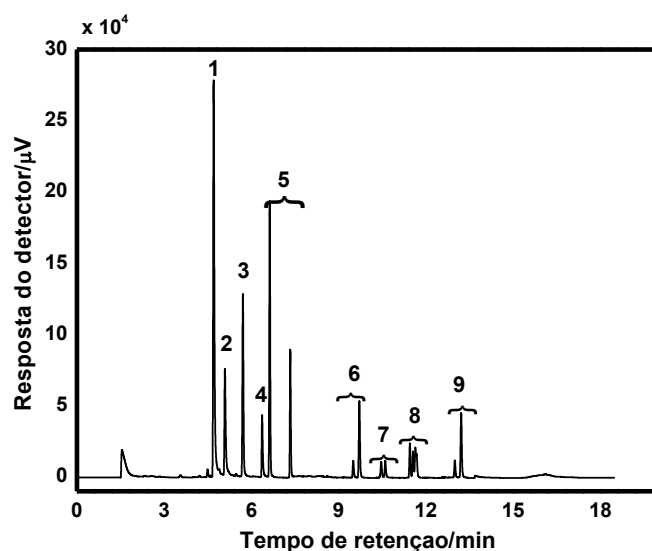


Figura 2.1 – Cromatograma obtido da análise dos nove agrotóxicos em acetonitrila na concentração $300 \mu\text{g L}^{-1}$, onde: 1- clorotalonil ($t_R = 4,71$), 2 – parationa metílica ($t_R = 5,04$), 3 – clorpirifós ($t_R = 5,71$), 4 – procimidona ($t_R = 6,35$), 5- α -endossulfam, β -endossulfam ($t_R = 6,57$ - $7,31$), 6 – λ -cialotrina ($t_R = 9,48$ - $9,7$), 7 – permetrina ($t_R = 10,44$ - $10,56$), 8 – cipermetrina ($t_R = 11,42$ - $11,53$ - $11,71$), 9 – deltametrina ($t_R = 12,98$ - $13,2$).

2.3.2. Avaliação do efeito de matriz

Para a avaliação do efeito de matriz foram construídas curvas analíticas para cada um dos agrotóxicos na faixa de concentração de 100 a $500 \mu\text{g L}^{-1}$. As curvas analíticas foram preparadas em solvente puro, em extratos obtidos pela ESL-PBT sem ajuste de pH da água utilizada na etapa de extração ($\text{pH}=6$) e em extrato obtido pela ESL-PBT com ajuste de pH da água da etapa de extração ($\text{pH} = 3,6$). As curvas analíticas para todos os agrotóxicos, em todas as matrizes, nos dois valores de pH foram lineares, com $r^2 > 0,99$.

As variações observadas nas inclinações das duas curvas analíticas (solvente e matriz) indicam que os componentes da matriz contribuem para introdução de um erro sistemático proporcional às análises cromatográficas. Quando o coeficiente linear é alterado, esses mesmos componentes da matriz induzem um erro sistemático constante [17; 18]. Geralmente o efeito de matriz é avaliado pela relação das inclinações das curvas analíticas preparadas em

extratos da matriz e em solvente puro [3], uma vez que a diferença entre os coeficientes lineares (no solvente e no extrato) pode ser devida, principalmente, a um aumento da linha de base. Esse aumento acontece por influência de componentes da matriz que estão presentes e são detectados constantemente. Isso gera um erro na resposta não relacionado a perdas no injetor (principal responsável pelo efeito de matriz), o que justifica o aumento da resposta ser constante em diferentes concentrações [19].

Na Tabela 2.3 são apresentados os resultados obtidos do efeito de matriz para os extratos das amostras de batata, maçã e solo em pH sem ajuste (≈ 6) e em pH ajustado (3,6), respectivamente.

Tabela 2.3 – Efeito dos componentes de três matrizes na resposta cromatográfica dos agrotóxicos (%), em função do pH dos extratos.

analito	batata		maçã		solo	
	pH $\approx$ 6	pH=3,6	pH $\approx$ 6	pH=3,6	pH $\approx$ 6	pH=3,6
clorotalonil	-17,59	-3,08	-14,03	17,90	-10,20	-8,41
parationa	-6,96	-0,98	-9,29	7,48	1,48	-3,90
clorpirifós	-1,49	5,03	-2,11	12,28	2,77	-5,11
procimidona	-4,03	-1,20	-4,88	5,85	1,95	-3,30
endossulfam	-6,96	-1,86	-4,43	9,72	2,68	-4,03
cialotrina	9,97	17,06	1,03	22,07	2,37	-3,55
permetrina	21,96	26,19	12,32	25,62	17,44	5,92
cipermetrina	7,58	28,12	5,99	18,06	-4,70	14,47
deltametrina	23,18	26,14	8,70	32,89	-0,10	-0,02

O efeito de matriz observado na análise cromatográfica dos agrotóxicos nessas matrizes foi relativamente pequeno quando comparado com o efeito observado em matrizes como tomate, abacaxi e uva [12]. Para o conjunto de agrotóxicos e matrizes estudadas observa-se um efeito de matriz negativo associado aos agrotóxicos com menor tempo de retenção. Uma relação entre o tempo de retenção dos agrotóxicos e o efeito de matriz pode ser feita quando se analisa a Figura 2.2.

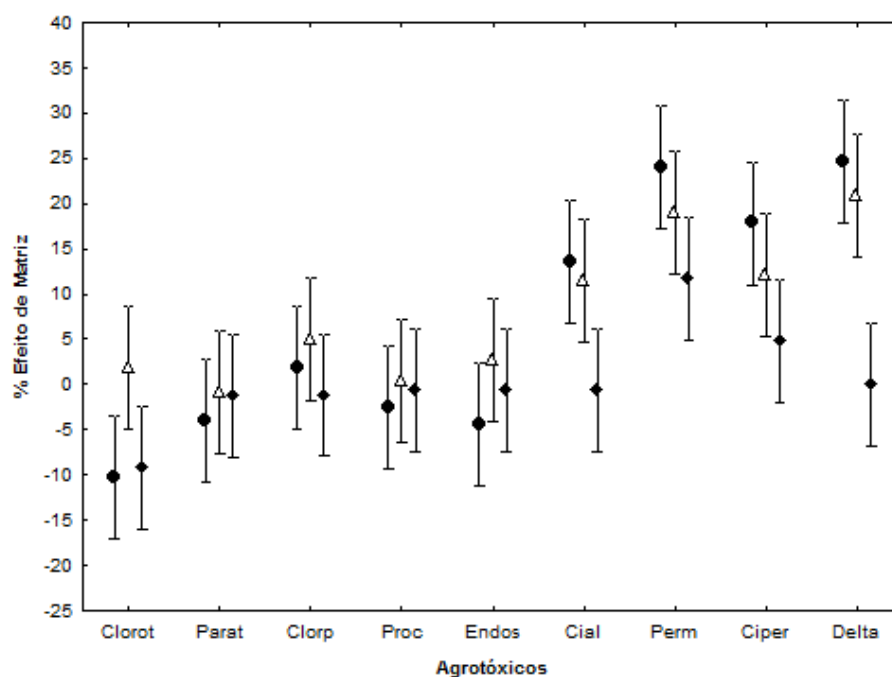


Figura 2.2 - Médias marginais do efeito de matriz (eixo y) observado na análise de agrotóxicos em função das matrizes. Onde: maçã (Δ); batata (●) e solo (◆). Abreviações: Clorot: clorotalonil; Parat: parationa metílica; Clorp: clorpirifós; Proc: procimidona; Endos: endossulfam; Cial: λ -cialotrina; Perm: permetrina; Ciper: cipermetrina; Delta: deltametrina.

Uma análise das médias marginais para os níveis dos agrotóxicos (Figura 2.2), indica que, clorotalonil, parationa, clorpirifós, procimidona e endossulfam, que são eluídos nessa ordem, sofrem efeitos de matriz similares e menos acentuados. Os agrotóxicos λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina, deltametrina, pertencentes ao grupo dos piretroides, sofrem influência dos componentes das matrizes de forma significativa por serem menos polares e eluídos no final da corrida cromatográfica. Além disso, os piretroides apresentam elevada massa molar (acima de 400 g mol^{-1}) que dificulta a volatilização, sofrendo maiores efeitos[11]. Esses resultados mostram que o efeito de matriz se relaciona ao tempo de retenção do analito, onde compostos com maior tempo de retenção sofrem maior efeito de matriz. Resultados semelhantes foram obtidos por Pinho *et al.* (2010), onde foi observado o aumento do efeito de matriz para compostos com maiores tempos de retenção [3].

Em relação ao efeito nas respostas cromatográficas dos analitos provocados pelos componentes das matrizes, uma avaliação pode ser feita ao analisar a Figura 2.3. Observa-se que a matriz solo causa diminuição na resposta cromatográfica dos agrotóxicos, enquanto as matrizes batata e maçã produzem efeitos positivos e estatisticamente iguais. Isto ocorre possivelmente pela maior quantidade de coextrativos extraídos nas matrizes batata e maçã. Essas matrizes são ricas em carboidratos [20], que certamente são extraídos para a fase orgânica e afetam a resposta cromatográfica.

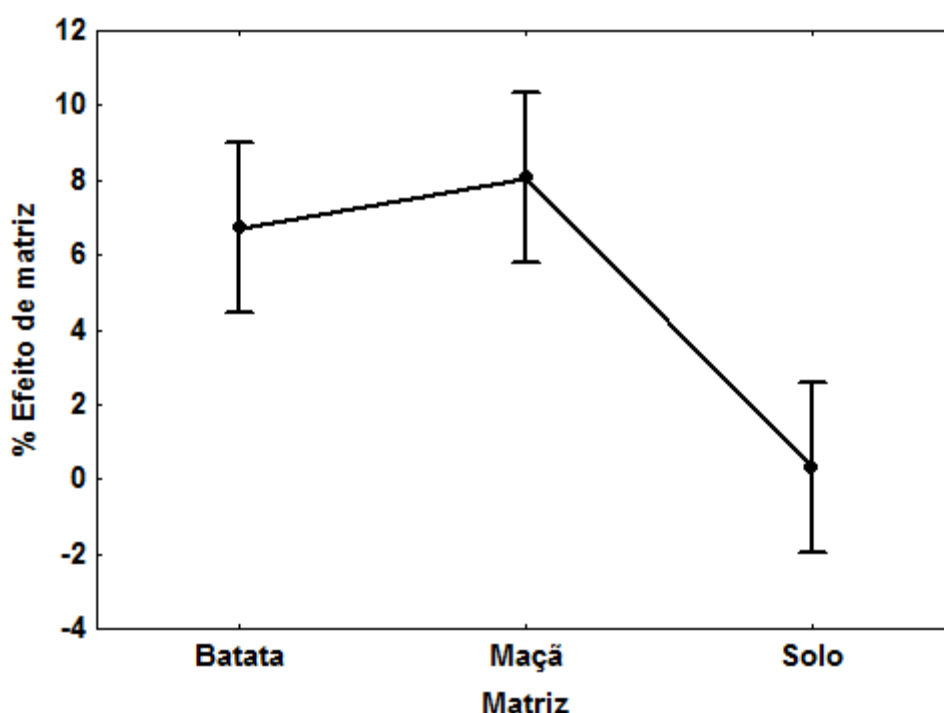


Figura 2.3 – Médias marginais do efeito de matriz observado na análise de agrotóxicos em extratos orgânicos obtidos de batata, maçã e solo pela ESL-PBT.

2.3.3. Influência do pH no efeito de matriz

Em estudos anteriores, ao variar o pH da água destilada para valores baixos, observou-se que o pH não afetou a extração dos agrotóxicos da fase aquosa para a fase orgânica, não influenciando diretamente na resposta cromatográfica dos agrotóxicos estudados. Entretanto, foi observado que o pH

influencia na extração dos coextrativos das amostras complexas, influenciando então no efeito de matriz [12].

Com o objetivo de avaliar a influência do pH no efeito de matriz, extratos orgânicos de amostras de batata, maçã e solo, que naturalmente possuem pH próximo de 6, foram obtidos por ESL-PBT conforme descrito na Tabela 2.1. Substituindo o volume de água (batata e solo) e o volume de solução de Na_2HPO_4 (maçã) pelo mesmo volume de água com o pH ajustado para 3,6 foram obtidos os extratos em meio ácido. De acordo com Sousa *et.al* (2012), as matrizes mais ácidas causam maior efeito sobre as respostas dos analitos, e a matriz abacaxi, que possui extrato aquoso com $\text{pH} = 3,6$ (valor mais baixo dentre as matrizes estudadas), provocou maiores alterações nas respostas [12]. Com base nesses resultados o valor de $\text{pH} = 3,6$ foi escolhido para realização desse estudo, pois mais coextrativos devem ser extraídos nesse valor de pH.

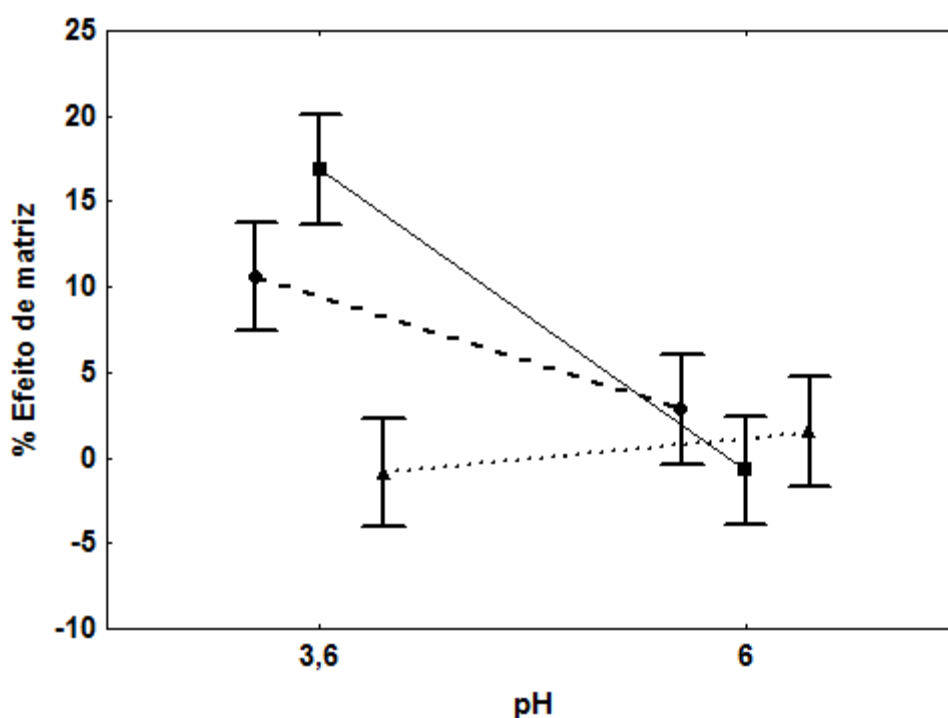


Figura 2.4 - Médias marginais do efeito de matriz (eixo y) em função da interação entre as matrizes e os valores de pH (eixo x). Onde: maçã (■) ; batata (●) e solo (Δ).

O gráfico acima (Figura 2.4) mostra que o pH = 6 contribuiu, na maioria das vezes, para os maiores efeitos negativos, enquanto os maiores efeitos positivos ocorrem, na maioria das vezes, em pH = 3,6, com exceção da matriz solo.

2.3.4. Análise de componentes principais

Os resultados do efeito de matriz sem e com ajuste de pH podem ser interpretados utilizando a Análise de Componentes Principais (Figura 2.5).

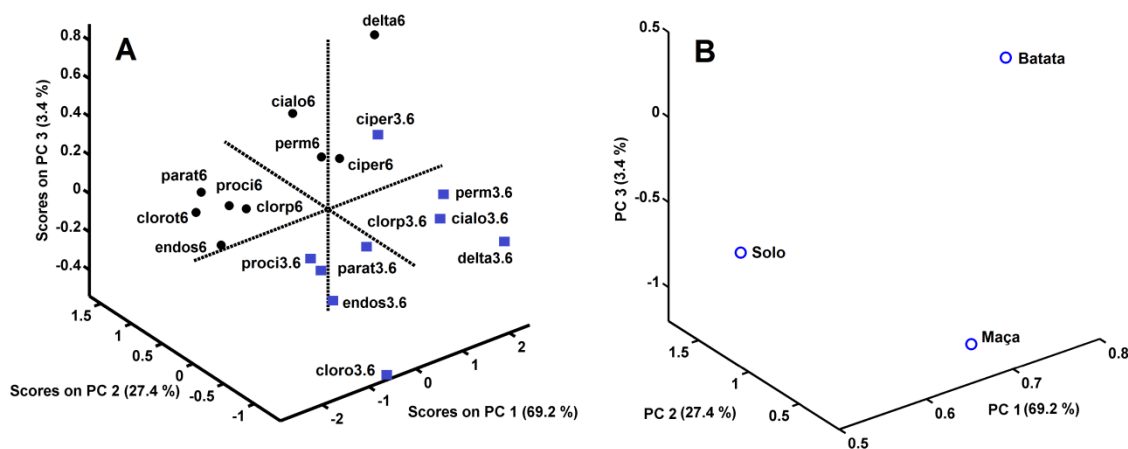


Figura 2.5 – Resultados da PCA: **(A)** scores da resposta cromatográfica de nove agrotóxicos em diferentes pH. (■) agrotóxicos em pH 3,6 e (●) agrotóxicos em pH 6,0. **(B)** loadings das variáveis batata, maçã e solo (○).

Pelos gráficos dos scores e dos loadings, observa-se que 100% das variâncias dos resultados são explicadas pelas três componentes principais. Os loadings mostram que as matrizes maçã e batata geram resultados semelhantes, mas que diferem um pouco dos resultados da matriz solo.

No gráfico dos scores verifica-se que o conjunto de resultados dos efeitos, independentemente das matrizes, é separado em dois grupos em função do pH. Existe um grupo formado pelos dados obtidos em pH = 3,6 que é separado do grupo de dados obtidos em pH = 6 pela PC2. Essa separação se deve ao fato de que no valor de pH = 3,6 mais coextrativos são extraídos das

matrizes batata e maçã, influenciando diretamente na resposta cromatográfica dos analitos.

Com o abaixamento do pH das amostras, os extratos orgânicos obtidos da maçã e batata pela ESL-PBT têm sua cor característica intensificada. Isto reforça a afirmação de que em valores de pH mais baixos maior quantidade de coextrativos são transferidos para o solvente orgânico. Com o aumento dos coextrativos na fase orgânica, mais sítios ativos são ocupados, aumentando a resposta dos analitos em extratos dessas matrizes quando comparados com as respostas em solvente.

É possível identificar ainda, separados pela PC1, dois grupos de resultados identificados pelos agrotóxicos. Um grupo formado pelos agrotóxicos permetrina, cialotrina, cipermetrina e deltametrina, que são aqueles para os quais se observam os maiores efeitos de matriz e que possuem os maiores tempos de retenção, conforme é confirmado pela Figura 2.2 das médias marginais dos resultados.

Com base em todos os resultados obtidos ao longo deste estudo, é possível afirmar que o pH pode modificar a extração de coextrativos das matrizes, influenciando de forma positiva ou negativa no efeito que esses coextrativos causam na resposta cromatográfica de agrotóxicos.

2.4 Referências bibliográficas

1. Chiaradia, M. C.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada a espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636. 2008.
2. Hajslová, J.; Holadová, K.; Kocourek, V.; Poustka, J.; Godula, M.; Cuhra, P.; Kempný, M. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 800, n.2, p. 283-295. 1998.
3. Pinho, G. P.; Silvério, F. O.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Starling, M. A. V. M. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatografia de agrotóxicos. **Química Nova**, v. 33, p. 909-913. 2010.
4. Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, p. 987-995. 2009.
5. Schenck, F. J.; Lehotay, S. J. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food. **Journal of Chromatography A**, v. 868, n.1, p. 51-61. 2000.
6. Poole, C. F. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n.1-2, p. 241-250. 2007.
7. Pinho, G. P. ; Silvério, F. O.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R. Evaluation of pesticide adsorption in gas chromatographic injector and column. **Química Nova**, v. 35, n.4, p. 738-742. 2012.
8. Hajslová, J.; Zrostlíková, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n.1-2, p. 181-197. 2003.
9. Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A. Headspace Solid Phase Microextraction Applied to the Analysis of Organophosphorus Insecticides in Strawberry and Cherry Juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n.12, p. 3359-3365. 2002.

10. Klotz, W. L.; Schure, M. R.; Foley, J. P. Determination of octanol-water partition coefficients of pesticides by microemulsion electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 930, n.1-2, p. 145-154. 2001.
11. Sánchez-Brunete, C.; Albero, B.; Martín, G.; Tadeo, J. L. Determination of Pesticide Residues by GC-MS Using Analyte Protectants to Counteract the Matrix Effect. **Analytical Sciences**, v. 21, p. 1291-1296. 2005.
12. Sousa, F. A.; Costa, A. I. G.; Queiroz, M. E. L. R.; Teófilo, R. F.; Neves, A. A.; Pinho, G. P. Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA. **Food Chemistry**, v. 135, p. 179-185. 2012.
13. Erney, D. R.; Gillespie, A. M.; Gilvydis, D. M.; Poole, C. F. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 638, n.1, p. 57-63. 1993.
14. Jimenez, J. J.; Bernal, J. L.; Del Nozal, M. J.; Toribio, L.; Martín, M. T. Gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection in the analysis of pesticides in honey after elution from a Florisil column: Influence of the honey matrix on the quantitative results. **Journal of Chromatography A**, v. 823, n.1-2, p. 381-387. 1998.
15. Menkissoglu-Spirodi, U.; Fotopoulou, A. Matrix effect in gas chromatographic determination of insecticides and fungicides in vegetables. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 84, n.1-3, p. 15-27. 2004.
16. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: editora da UNICAMP, 2006. 456 p.
17. Cuadros-Rodríguez, L.; Gámiz-Gracia, L.; Almansa-López, E. M.; Bosque-Sendra, J. M. Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n.11, p. 620-636. 2001.
18. Cuadros-Rodríguez, L.; García-Campaña, A. M.; Almansa-López, E.; Egea-González, F. J.; Lourdes Castro Cano, M.; Garrido Frenich, A.; Martínez-Vidal, J. L. Correction function on biased results due to matrix effects:

Application to the routine analysis of pesticide residues. **Analytica Chimica Acta**, v. 478, n.2, p. 281-301. 2003.

19. Santos, L. C. **Influência do método de extração, dos componentes da matriz e da temperatura da coluna na resposta cromatográfica de agrotóxicos**. 2011. 80 f. Mestrado - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

20. Nepa-Unicamp. **Tabela brasileira de composição dos alimentos**. 4.ed. Campinas: NEPA-Unicamp, 2011. 161 p.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DO ESTÁDIO DE MATURAÇÃO DO TOMATE NA ANÁLISE DE AGROTÓXICOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA

3.1. Introdução

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) é uma das hortaliças de maior comercialização no Brasil e é muito apreciada pelo seu alto valor nutritivo. É rico em vitamina A e C, rico em fosfato e potássio, além de apresentar cerca de 95% de água em sua composição [1].

A produção de tomate no Brasil é de aproximadamente 3 milhões de toneladas/ano sendo 65% destinado ao consumo *in natura* e 35% para processamento industrial [2]. Os frutos de tomate são altamente susceptíveis a ataques de pragas. Para evitar perdas na colheita, um grande número de agrotóxicos é usado para controlar as pragas que atacam as plantações de tomate, destacando-se dentre eles alguns piretroides e organofosforados [3]. A sucessiva aplicação de agrotóxicos e a não observância dos períodos de carência dos mesmos, faz com que resíduos desses compostos permaneçam nos frutos pós-colheita. Para garantir a qualidade desses frutos que são consumidos pela população, torna-se necessário analisar periodicamente resíduos de agrotóxicos nestes frutos. A análise de traços de contaminantes orgânicos em alimentos consiste tipicamente das seguintes etapas consecutivas: (i) isolamento de analitos da matriz da amostra, (ii) remoção de coextrativos do extrato bruto e (iii) identificação e quantificação dos analitos alvo [4].

A cromatografia em fase gasosa (CG) é a técnica analítica mais empregada na quantificação de agrotóxicos em diversas matrizes alimentícias e ambientais. Entretanto, durante as análises cromatográficas, os componentes da matriz contidos nos extratos orgânicos podem influenciar na quantificação dos analitos de interesse, gerando resultados duvidosos [5]. Em estudos bem elaborados esses resultados são avaliados, e à alteração na resposta cromatográfica (devido à presença de coextrativos) dá-se o nome de efeito de matriz. O efeito de matriz é observado quando uma considerável diferença de resposta é obtida entre padrões preparados no solvente e aqueles preparados no extrato da matriz [6].

A composição dos frutos de tomate varia de acordo com o estágio de maturação. A coloração verde dos frutos imaturos é devida à presença de clorofila. Com o início da maturação, ocorre a degradação da clorofila e a síntese de

pigmentos amarelos, principalmente xantofilas e β -caroteno, atingindo, posteriormente, a cor avermelhada em razão do acúmulo de licopeno. As cores dos frutos de tomate diferem do amarelo para o vermelho alaranjado, dependendo da razão licopeno/ β -caroteno da fruta [7]. O teor de açúcares e de ácidos orgânicos também varia durante a maturação. Os açúcares (sacarose e frutose) constituem cerca de 65% dos sólidos solúveis totais e se acumulam na fase final de amadurecimento do fruto [8].

Algumas propriedades físicas e químicas que variam ao longo da maturação dos frutos são utilizadas como índices de maturação. A avaliação de parâmetros de qualidade tais como acidez, sólidos solúveis, pH e cor é feita durante a maturação dos frutos.

A presença de coextrativos do tomate nos extratos orgânicos causa efeitos significativos na resposta cromatográfica de agrotóxicos analisados por cromatografia gasosa [9; 10; 11]. No presente trabalho procurou-se correlacionar o efeito de matriz observado na análise de cinco agrotóxicos com algumas propriedades físico-químicas do tomate. Alguns parâmetros de maturação dos frutos de tomate, tais como, cor, pH, °Brix, acidez e teores de licopeno e β -caroteno foram avaliados durante o período de amadurecimento dos frutos e correlacionados com o efeito de matriz observado nas análises por cromatografia gasosa com detector captura de elétrons.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Amostras

Amostras de tomate verde hidropônico tipo salada, isentas de agrotóxicos, foram adquiridas no mercado de Viçosa – MG e armazenadas à temperatura ambiente durante o processo de maturação. A inexistência de resíduos de agrotóxicos foi confirmada pela análise cromatográfica de um extrato orgânico obtido das amostras.

As amostras foram classificadas em cinco estádios de maturação ao longo do período de armazenamento. **(1º)** Verde-rosado: entre 0% a 10% da superfície do

fruto possuindo coloração avermelhada ou amarelada; **(2º)** Rosa-esverdeado: entre 10% e 30% da superfície do fruto com coloração avermelhada, rósea ou amarelada; **(3º)** Róseo: entre 30% e 60% da superfície do fruto com coloração avermelhada ou rósea; **(4º)** Vermelho-claro: entre 60% e 90% da superfície do fruto possuindo coloração róseo avermelhada ou vermelha e **(5º)** Vermelho: mais de 90% da superfície do fruto, na soma de todas as áreas superficiais, possuindo coloração vermelho-intensa [2].

3.2.2. Caracterização das amostras de tomate

Para determinação de cor, pH, acidez total titulável e sólidos solúveis foram amostrados três frutos em cada estágio.

A cor foi medida com colorímetro “*Tristimulus*” Minolta® (Ramsey, USA) modelo CR-400 (iluminante C e ângulo de visão 10° e espaço cromático CIELAB) com leitura direta de reflectância das coordenadas “L*” (luminosidade), “a*” (de verde a vermelho) e “b*” (de amarelo a azul). Com os valores das coordenadas L*, a* e b* foi possível gerar parâmetros relacionados ao estágio de maturação dos tomates (a*/b*) [12]. Foram feitas quatro leituras na região mediana dos frutos no sentido longitudinal.

A acidez foi determinada por titulação de 50,0 mL do suco da polpa, com NaOH 0,1 mol L⁻¹ padronizado e 3 gotas de indicador fenolftaleína. Para essa análise, 5,0 g de polpa foram homogeneizadas em 50,0 mL de água destilada [13]. As análises foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos em gramas de ácido cítrico por 100 g de amostra (Equação 3.1).

$$\text{g de ácido cítrico/100g} = 0,6404 \frac{V}{m} \quad (3.1)$$

onde: V = volume da solução de NaOH gasto na titulação (mL); e m = massa da amostra (g).

A medida de pH foi feita por imersão direta do eletrodo na amostra de tomate preparada para determinação da acidez total titulável. A determinação do pH da

polpa foi efetuada utilizando-se pHmetro de bancada digital Homis® (São Paulo, Brasil), modelo MPA 210.

O teor de sólidos solúveis da polpa dos tomates foi determinado por um refratômetro manual modelo 107 - 0 a 90% BRIX – Biobrix® (São Paulo, Brasil). O tomate foi partido ao meio, depositando-se três gotas de amostra sobre a superfície de leitura do refratômetro. Os resultados foram expressos em °Brix.

3.2.3. Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT)

Os extratos orgânicos de amostras de tomate foram obtidos a partir da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) para posterior análise cromatográfica.

A técnica de extração consiste em pesar 4,0 gramas da amostra, transferi-la para um frasco de vidro transparente (22,0 mL) e, em seguida, adicionar a mistura extratora, composta por 8,0 mL de acetonitrila (grau HPLC, Vetec - Rio de Janeiro, Brasil), 0,5 mL de água e 1,5 mL de acetato de etila (grau HPLC, Vetec - Rio de Janeiro, Brasil). Este sistema é então submetido à homogeneização em um banho ultrassônico da Unique® (São Paulo, Brasil) com uma potência de 25 kHz e resfriado em freezer a -20 °C por um período de 6 horas. Após este período, é obtido um sistema bifásico constituído da fase sólida (congelamento da fase aquosa e da matriz) e da fase líquida (sobrenadante). O líquido é passado por 1,50 g de sulfato de sódio anidro com grau de pureza superior a 99% (Vetec - Rio de Janeiro, Brasil). O filtrado obtido (extrato) é recuperado em balão volumétrico de 10,0 mL e o volume aferido com acetonitrila [9].

3.2.4. Quantificação dos carotenoides

Cristais de licopeno foram obtidos diretamente do tomate de acordo com o método proposto por Mercadante & Nunes (2004). Tal método consiste de uma etapa prévia para retirada de água com 4 extrações de 30 minutos cada com 30 mL de etanol, seguido por 4 extrações com acetato de etila de 120 minutos cada e relação massa/volume de 1:0,7. O extrato orgânico é evaporado em um rotavapor e

recuperado em diclorometano/etanol (1:4) (Vetec - Rio de Janeiro, Brasil) a temperatura de 50-60 °C, colocado em banho de gelo para abaixamento gradual da temperatura e em seguida levado ao freezer por uma noite para a formação dos cristais. Os cristais foram filtrados em papel Whatman Chr 3 mm (Maidstone, UK), lavados com etanol gelado, e secos em estufa a vácuo à temperatura ambiente [14].

Os cristais obtidos foram solubilizados em éter de petróleo e a solução transferida para um balão volumétrico completando-se o volume para 100 mL com éter de petróleo. Foi feita a leitura no espectrofotômetro GBC 20, modelo CINTRA (Homney, WV, USA) no comprimento de onda de 470 nm [2]. O teor de licopeno foi obtido pela Equação (2) [15]:

$$\mu\text{g/g} = \frac{A \times V \times 1.000.000}{A_{\text{cm}}^{1\%} \times m \times 100} \quad (3.2)$$

onde A = absorvância da solução no comprimento de onda de 470 nm, V = volume final da solução, $A_{\text{cm}}^{1\%}$ é a absortividade do licopeno em éter de petróleo e m = massa da amostra tomada para a análise. O valor de $A_{\text{cm}}^{1\%}$ é 3450 [15].

Para a quantificação do licopeno e do β -caroteno nos extratos orgânicos de tomate obtidos por ESL-PBT foi construída uma curva analítica contendo o licopeno nas concentrações 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 2,25 e 2,5 mg L⁻¹ em acetonitrila. Dessas soluções foram obtidas as absorvâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de máxima absorvância do licopeno (470 nm) e foi plotado um gráfico com os valores de absorvâncias versus as concentrações dos padrões. As concentrações dos dois carotenóides nos extratos orgânicos dos tomates em diferentes estádios de maturação foram calculadas pela equação de regressão linear obtida da curva analítica e foram expressas em termos da concentração de licopeno.

3.2.5. β -caroteno

A solução de β -caroteno foi preparada pela dissolução do padrão p.a Sigma (Seelze, Alemanha) em metanol na concentração de 600 mg L⁻¹. Uma solução na concentração de 10 mg L⁻¹ foi preparada pela diluição em acetonitrila. Soluções

desse carotenóide em diferentes concentrações foram adicionadas a padrões dos agrotóxicos para verificar o efeito na resposta cromatográfica dos mesmos.

3.2.6. Análise por CG/DCE

Soluções padrão estoque de clorotalonil (99,3% m/m), iprodiona (99,3% m/m), deltametrina (99,7% m/m), adquiridos da Sigma Aldrich, (Seelze, Alemanha), clorpirifós (99,0% m/m), adquirido da Chem Service (West Chester, USA) e permetrina (92,2% m/m) adquirida da Syngenta (São Paulo, Brasil), foram preparadas em acetonitrila na concentração de 1000 mg L⁻¹ e armazenadas em temperatura de 4 °C. A partir da diluição das soluções estoque, foram preparadas soluções contendo os cinco agrotóxicos em concentrações de 10 mg L⁻¹ no mesmo solvente. Em estudos anteriores onde avaliou-se o efeito dos componentes de sete matrizes na análise de onze agrotóxicos por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons, a análise de componentes principais (PCA) separou grupos de agrotóxicos que sofreram efeitos semelhantes, sendo a deltametrina bem separada dos demais agrotóxicos, o clorotalonil e clorpirifós pertencentes a outro grupo e a iprodiona e permetrina pertencentes a outro grupo bem separado dos demais [11]. Esses agrotóxicos foram escolhidos para esse estudo porque abrangeram todos os grupos separados pela PCA.

Foi utilizado nas análises um cromatógrafo a gás da Shimadzu (Kyoto, Japão), modelo GC-2014 equipado com um detector por captura de elétrons (DCE), auto injetor AOC – 20i.

A separação cromatográfica dos analitos foi realizada em uma coluna capilar HP-5 da Agilent Technologies (Palo Alto, USA), com fase estacionária composta de 5% difenil e 95% dimetilsiloxano (30 m x 0.25 mm d.i., 0,1 µm de espessura do filme), sendo nitrogênio (Air Products, São Paulo, Brasil), 99,999 % de pureza, o gás de arraste a uma vazão de 1,2 mL min⁻¹. A coluna inicialmente a 150 °C permaneceu nesta temperatura por 2 min, foi aquecida a 40 °C min⁻¹ até 210 °C, permanecendo nessa temperatura por 1 min e posteriormente aquecida a 40 °C min⁻¹ até 260 °C permanecendo nesta temperatura por 1 min. Finalmente foi aquecida a 30 °C min⁻¹ até 290 °C permanecendo por 5 min nessa temperatura. As temperaturas do injetor

split/splitless e detector foram 280 e 300 °C, respectivamente. Foi injetado 1,0 µL de amostra no cromatógrafo a uma razão de split de 1:5. O tempo total de análise foi de 12,75 minutos.

3.2.7. Efeito de matriz

A influência dos componentes do tomate em diferentes estádios de maturação na resposta do detector foi avaliada pelo preparo de duas séries de soluções-padrão contendo os cinco agrotóxicos na concentração de 100 µg L⁻¹. A primeira série foi obtida pela diluição da solução de trabalho contendo os agrotóxicos nas concentrações de 10 mg L⁻¹ em acetonitrila pura (triplicata). A segunda série dos padrões foi preparada pela diluição da mesma solução de trabalho em extratos orgânicos da matriz (triplicata), obtidos a partir da ESL-PBT. A análise dos princípios ativos foi realizada por CG-DCE.

Para avaliar a influência dos coextrativos nas respostas cromatográficas dos agrotóxicos, as áreas obtidas para os analitos em solvente puro foram relacionadas com as áreas obtidas em extrato orgânico das matrizes utilizando a Equação 3.1.

$$\text{Efeito de matriz (\%)} = \left(\frac{X_1}{X_2} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

onde X₁ é a média das áreas da solução analítica de cada agrotóxico preparada em extrato da matriz e X₂ é a média das áreas das soluções desses agrotóxicos preparadas em solvente puro.

A influência da concentração de licopeno, β-caroteno e a mistura desses dois carotenoides na resposta cromatográfica dos cinco agrotóxicos analisados foi avaliada. À soluções padrão contendo os cinco agrotóxicos em acetonitrila nas concentrações 100, 300 e 500 µg L⁻¹ foram adicionados os dois carotenoides separadamente, bem como a mistura destes, nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹. A porcentagem do efeito de matriz foi calculada pela Equação 3.1.

3.2.8. Análises estatísticas

A fim de relacionar os resultados do efeito de matriz sobre os analitos, causados pelos componentes do tomate, em função da adição de soluções padrão de licopeno, β -caroteno e da mistura desses dois carotenoides nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹ a Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada. Uma matriz 15×15 foi construída inicialmente. As cinco diferentes concentrações de licopeno, β -caroteno e mistura destes foram definidas como variáveis e, portanto, foram colocadas nas colunas. Os agrotóxicos nas três concentrações trabalhadas (100, 300 e 500 µg L⁻¹) foram definidos como amostras e, portanto, foram colocados nas linhas.

A fim de alcançar uma melhor interpretação dos dados, resultados de efeito de matriz obtidos em trabalhos anteriores na análise dos mesmos agrotóxicos em batata, maçã e solo [11] foram utilizados numa etapa consecutiva. Uma nova matriz 5×7 foi construída contendo estes dados juntamente com o efeito de matriz causado pelo tomate no seu último estágio de maturação (que possui concentração de licopeno e de β -caroteno na fase extratora próxima de 2,0 mg L⁻¹), pelas soluções padrão contendo licopeno na concentração 2,0 mg L⁻¹, β -caroteno e a mistura desses dois carotenoides nessa mesma concentração. As matrizes tomate, batata, maçã, solo e as soluções padrão contendo licopeno, caroteno e a mistura destes foram definidos como variáveis e foram colocadas nas colunas. Os cinco agrotóxicos foram definidos como amostras e, portanto, foram colocados nas linhas.

Os dados das matrizes foram importados pelo Software MATLAB 7 (MathWorks, Natick, USA) e submetidos aos tratamentos quimiométricos usando o pacote PLS_Toolbox 6.2 (Eigenvector Technologies, Manson, USA). As colunas das matrizes foram autoescaladas antes da PCA ser executada.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Quantificação de licopeno e β -caroteno nos extratos orgânicos de tomate

Trabalhos anteriores têm mostrado a influência dos componentes do tomate nas respostas cromatográficas de pesticidas durante as análises por CG [10; 11]. Entre os principais constituintes do tomate estão os pigmentos. Esses pigmentos quando presentes no extrato orgânico podem se depositar no sistema cromatográfico durante as injeções ou dependendo das condições de análise podem se decompor no injetor formando compostos voláteis [16].

Os teores de licopeno e β -caroteno nos extratos orgânicos de tomate obtidos por ESL-PBT foram quantificados por espectrofotometria UV-Visível e expressos em termos da concentração de licopeno. Espectros de absorção das soluções padrão de licopeno e β -caroteno foram obtidos na faixa de 380 a 600 nm. Na Figura 3.1 são apresentados os espectros desses carotenóides em acetonitrila.

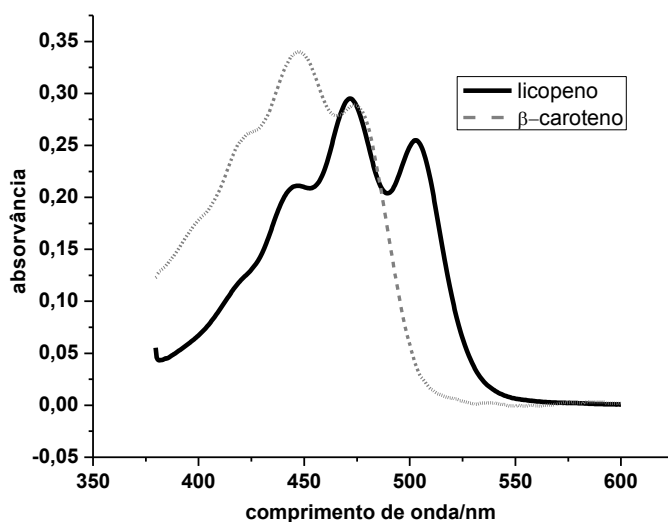


Figura 3.1. Espectros de absorção de solução padrão de licopeno e β -caroteno na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Os teores dos carotenoides nos extratos orgânicos de tomate nos diferentes estádios de maturação, expressos em mg L⁻¹ de licopeno estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Concentrações dos carotenoides na fase orgânica nos estádios de maturação

	Estádios de maturação				
	Verde rosado	Rosa esverdeado	Róseo	Vermelho claro	Vermelho
Carotenoides (mg L ⁻¹ de licopeno)	0,79	1,56	1,60	2,01	2,07

Os teores de carotenoides presentes nos extratos orgânicos confirmam a avaliação dos estádios de maturação feita pela relação de cor (a^*/b^*). A principal informação obtida é que à medida que o fruto amadurece, as concentrações de licopeno e de β -caroteno aumentam nos extratos orgânicos obtidos pela técnica ESL-PBT, conforme esperado.

Não foi determinado o teor de licopeno e β -caroteno nos tomates *in natura*, pois para o estudo do efeito de matriz na análise cromatográfica é importante conhecer as concentrações destes carotenoides nos extratos orgânicos a serem injetados no sistema cromatográfico. Por isso os valores encontrados são baixos em relação aos descritos na literatura, onde se determina a concentração de carotenoides nos frutos e utilizam-se solventes como o éter de petróleo [14; 2]. Em solventes utilizados na mistura extratora como acetonitrila e acetato de etila esses compostos são menos solúveis e por isso são extraídos em menor quantidade.

3.3.2. Caracterização das amostras de tomate

As medidas de cor, pH, acidez total titulável e sólidos solúveis das amostras de tomate foram feitas conforme descrito no item 3.2.2. Na Tabela 3.2 são apresentadas as médias dos valores obtidos para esses parâmetros.

A porcentagem de sólidos solúveis, que é representada pelo °Brix representa a porcentagem (em massa) de sólidos que se encontram dissolvidos no alimento [17]. Os valores encontrados nos diferentes estádios de maturação variaram entre 5,6 e 6,0 ° Brix, não apresentando diferença significativa ao longo da maturação. Esses valores estão próximos aos mencionados na literatura referente às análises de tomates [18; 19].

Tabela 3.2 – Parâmetros de qualidade dos frutos de tomate ao longo da maturação.

Parâmetro	Estádios de maturação				
	Verde rosado	Rosa esverdeado	Róseo	Vermelho claro	Vermelho
Sólidos Solúveis (°Brix)	5,60±0,0 ^a	5,60±0,0 ^a	5,0±0,82 ^a	5,70±0,14 ^a	6,00±0,03 ^a
pH	4,25±0,0 ^a	4,17±0,04 ^a	4,14±0,15 ^a	4,26±0,04 ^a	4,25±0,04 ^a
Acidez titulável (g. ác.cítrico/100g)	0,30±0,0 ^a	0,32±0,05 ^a	0,37±0,04 ^a	0,32±0,01 ^a	0,33±0,03 ^a
Cor (a*/b*)	0,08±0,01 ^a	0,10±0,06 ^a	0,40±0,3 ^{ab}	0,77±0,2 ^b	1,11±0, 1 ^b

Todos os valores são valores médios (média ± desvio padrão)

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Os valores de pH encontrados se mantiveram próximos a 4.2 em todos os estádios e coincidem com valores registrados na literatura por Cliff *et al.* (2009) e Ferreira *et al.* (2010) [20; 21].

O teor de ácido cítrico também não foi diferente estatisticamente nos diferentes estádios de maturação ao nível de confiança avaliado, variando de 0,30 a 0,37 g. ác. Cítrico/100g. Valores superiores de acidez titulável foram encontrados por Borguini (2005) e podem ser atribuídos à diferença genética, solo, manejo e temperatura média do lugar em que foram cultivados os frutos [22].

As relações a*/b* e (a*/b*)² têm sido normalmente usadas como índice de maturação dos frutos e apresentam elevada correlação com os diferentes estádios de maturação [12]. O parâmetro cor foi o que apresentou melhor relação com os diferentes estádios de maturação, apresentando um aumento à medida que os frutos amadurecem.

3.3.3. Análise cromatográfica

As condições cromatográficas otimizadas para análise simultânea dos cinco agrotóxicos permitiram uma boa separação dos compostos conforme pode ser observado no cromatograma apresentado na Figura 3.2 (A). O tempo de retenção dos picos referentes a cada composto foi utilizado para identificação no extrato orgânico de tomate. A quantificação dos compostos permetrina e deltametrina, que possuem mais de um pico, foi realizada somando-se as áreas dos picos referentes aos isômeros de cada um [23].

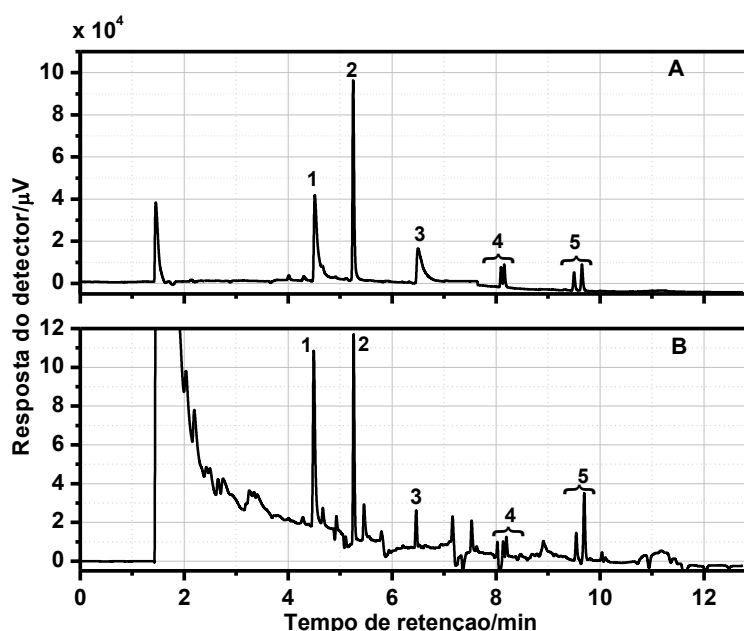


Figura 3.2 – Cromatograma de uma solução padrão dos agrotóxicos em acetonitrila (A) e em extrato orgânico de tomate (B) na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, onde: 1 – clorotalonil ($t_R = 4,51$) , 2- clorpirifós ($t_R = 5,26$), 3 – iprodiona ($t_R = 6,44$), 4 – permetrina ($t_R = 8,14$ - $8,23$), 5 – deltametrina ($t_R = 9,52$ - $9,71$).

Observa-se que a presença dos coextrativos do tomate causa modificações na linha de base dos cromatogramas e as respostas dos agrotóxicos também são alteradas (Figura 3.2 B). Entretanto, nenhum interferente no mesmo tempo de retenção dos agrotóxicos foi detectado.

3.3.4. Efeito de matriz

Em trabalhos anteriores observou-se a influência dos componentes de diversas matrizes na resposta cromatográfica destes cinco compostos durante as análises por CG-DCE [5; 11]. Entretanto, uma análise sistemática da influência dos diferentes estágios de maturação de um fruto ainda não foi relatado na literatura.

As porcentagens de efeito de matriz foram avaliadas pela diferença das respostas dos cinco agrotóxicos quando analisados em solvente puro (acetonitrila) e em extratos orgânicos dos tomates nos diferentes estádios de maturação (obtidos por ESL-PBT, conforme descrito no item 3.2.3). Os resultados são apresentados na Figura 3.3.

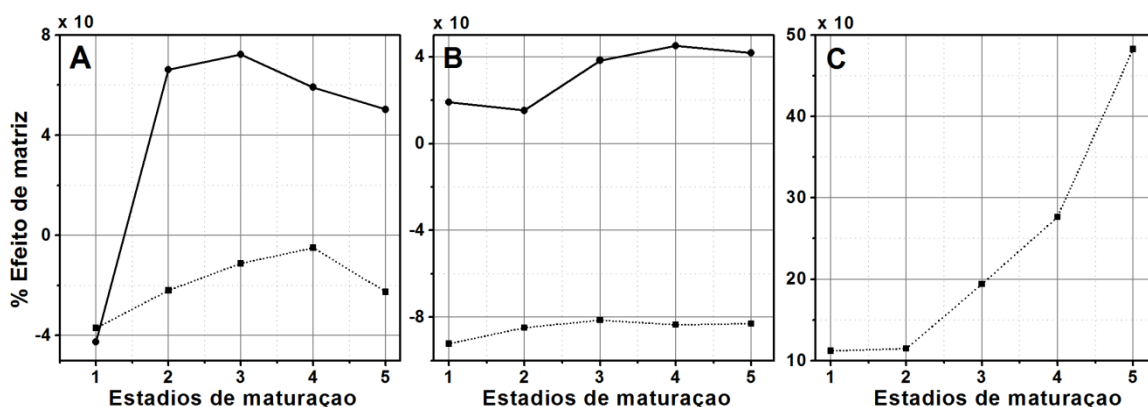


Figura 3.3. Efeitos de matriz para os agrotóxicos a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ nos diferentes estádios de maturação, onde: verde rosado (1), rosa esverdeado (2), róseo (3), vermelho claro (4), vermelho (5). (A) clorpirifós (■) e clorotalonil (●); (B) iprodiona (■) e permetrina (●); (C) deltametrina.

O efeito de matriz para cada um dos agrotóxicos iprodiona, clorpirifós e permetrina, foram estatisticamente semelhantes nos cinco estádios de maturação. O pesticida clorotalonil, que apresenta menor tempo de retenção na análise cromatográfica, apresentou efeito de matriz diferenciado somente no primeiro estágio de maturação. Já a deltametrina (maior tempo de retenção), apresentou influência dos coextrativos de forma significativa ao longo dos estádios de maturação do tomate. Esses resultados nos sugerem que o efeito de matriz apresentado pelos dois pesticidas tem uma correlação com a cor do fruto, uma vez

que parâmetros como °Brix, pH e acidez titulável não apresentaram modificação nos diferentes estádios de maturação, conforme já apresentado.

Com o intuito de verificar a existência de correlação entre as características físicas e químicas dos tomates nos diferentes estádios de maturação com o efeito de matriz, um estudo de correlação entre esses fatores foi realizado utilizando o Excel. Na Tabela 3.3 são apresentados os resultados.

Tabela 3.3 – Correlação entre o efeito de matriz nos diferentes estádios de maturação e as características físicas e químicas dos tomates.

Agrotóxico	°Brix	AT	pH	Cor	Carotenoides
clorpirifos	-0,27	0,54	-0,22	0,45	0,75
iprodiona	-0,20	0,78	-0,43	0,58	0,86*
permetrina	0,07	0,45	0,24	0,87*	0,75
clorotalonil	-0,19	0,67	-0,50	0,39	0,81
deltametrina	0,57	0,18	0,43	0,97*	0,76

*Significativo a 5% de probabilidade.

A tabela de correlação possibilitou a escolha das variáveis significativas. A variável efeito da matriz na análise dos piretroides permetrina e deltametrina apresenta uma correlação linear com a cor. Ou seja, à medida que o fruto amadurece, a cor aumenta e o efeito de matriz para esses agrotóxicos é maior. Um gráfico do efeito de matriz *versus* cor foi plotado para esses dois agrotóxicos, dando origem a duas equações de regressão linear.

As correlações obtidas entre os efeitos de matriz observados para os agrotóxicos nos diferentes estádios de maturação e as concentrações de licopeno e β -caroteno nesses estádios mostraram-se elevadas. Observando os dados obtidos até o momento pode-se inferir que à medida que os frutos amadurecem a cor aumenta, aumentando a concentração de licopeno e beta caroteno nos frutos de tomate. A concentração desses carotenoides está correlacionada de maneira positiva com o efeito de matriz de todos os agrotóxicos estudados, sendo significativo a 5% de probabilidade apenas para a iprodiona, conforme verificado pelos dados da Tabela 3.3.

No sentido de avaliar a influência direta desses carotenoides na resposta cromatográfica dos analitos, soluções padrão desses compostos em diferentes concentrações foram adicionadas a soluções padrão dos agrotóxicos a 100, 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o efeito na resposta dos analitos provocado por esses componentes foi avaliado.

Os resultados foram agrupados em uma matriz conforme descrito no item 3.2.8 e a análise de componentes principais foi executada. Na Figura 3.4 são apresentados os resultados.

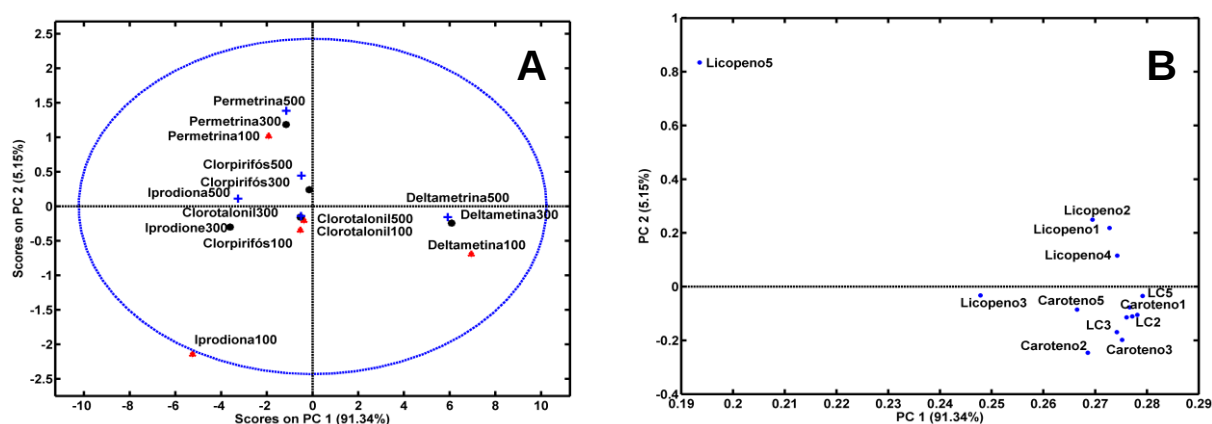


Figura 3.4. Resultados da PCA: (A) scores das respostas cromatográficas de cinco agrotóxicos em três concentrações em diferentes matrizes (B) loadings das variáveis licopeno, β -caroteno e mistura dos dois carotenóides. Abreviações: permet: permetrina; iprod: iprodiona; cloro: clorotalonil; clorpir: clorpirifós; deltamet: deltametrina; lico: licopeno; caro: β -caroteno; LC: mistura de licopeno e β -caroteno.

Pode-se observar que 96,55% da variância dos dados é explicada pela PCA. Analisando o gráfico dos *scores* observa-se que de maneira geral o efeito da matriz sobre as diferentes concentrações dos agrotóxicos é semelhante, fazendo com que um mesmo agrotóxico em concentrações diferentes se agrupe. A primeira componente separa muito bem a deltametrina dos demais agrotóxicos. Analisando o gráfico dos *loadings* percebe-se que essa separação é causada pelos componentes do tomate: licopeno, β -caroteno e a mistura destes carotenoides.

Como a resposta cromatográfica dos agrotóxicos em diferentes concentrações não foi influenciada diferentemente pelos componentes da amostra,

uma nova matriz foi construída inserindo valores de efeitos dos componentes das matrizes batata, maçã, solo [11] e tomate no último estágio de maturação juntamente com os efeitos encontrados quando foram utilizadas as soluções padrão dos carotenoides com os agrotóxicos na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Na Figura 3.5 são apresentados os resultados.

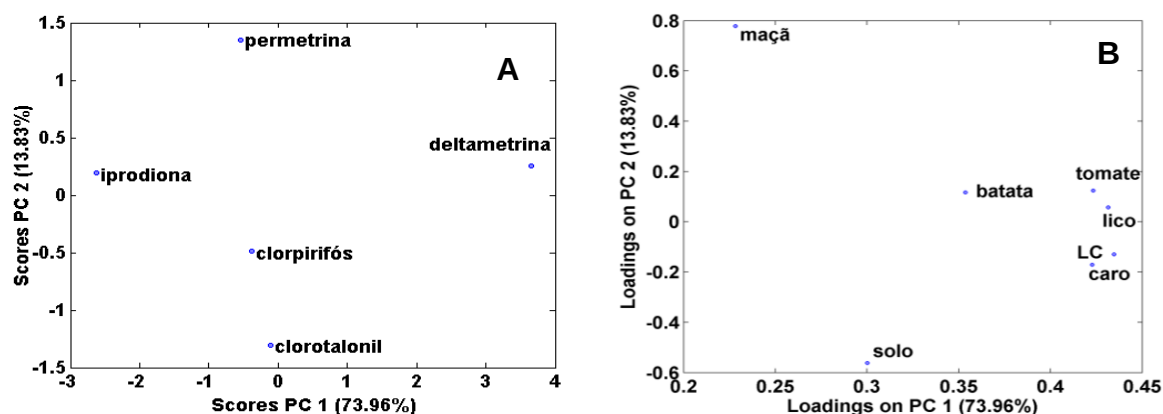


Figura 3.5. Resultados da PCA: (A) scores das respostas cromatográficas de cinco agrotóxicos na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em diferentes matrizes (B) loadings das variáveis licopeno, β -caroteno, mistura dos dois carotenoides, batata, maçã e solo. Abreviações: lico: licopeno; caro: β -caroteno; LC: mistura de licopeno e β -caroteno.

Quando inserimos os resultados da batata, maçã e solo observa-se nitidamente a separação do tomate e de seus componentes pela PC1, visualizada no gráfico dos *loadings*. Esses componentes são responsáveis pela separação da deltametrina dos demais agrotóxicos. A deltametrina foi o agrotóxico que apresentou maior correlação da cor (consequentemente das concentrações de licopeno e β -caroteno) com o efeito de matriz e isso é confirmado pela PCA.

Conclui-se então que o efeito na resposta cromatográfica dos analitos é afetado diretamente pelos componentes da matriz. Analisando os diferentes estágios de maturação do tomate, observa-se que com o aumento do grau de maturação ocorre o aumento da concentração de licopeno e β -caroteno nos extratos orgânicos aos quais são adicionados os analitos. Esse fato faz com que a resposta cromatográfica dos agrotóxicos seja maior, sendo significativamente para a

permetrina e deltametrina. Pela análise de componentes principais observa-se que esse efeito é mais significativo para a deltametrina.

3.4. Referências bibliográficas

1. Beckles, D. M. Factors affecting the postharvest soluble solids and sugar content of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 63, n.1, p. 129-140. 2012.
2. Carvalho, W.; Fonseca, M. E. N.; Silva, H. R.; Boiteux, L. S.; Giordano, L. B. Estimativa indireta de teores de licopeno em frutos de genótipos de tomateiro via análise colorimétrica. **Química Nova**, v. 23, p. 819-825. 2005.
3. Gambacorta, G.; Faccia, M.; Lamacchia, C.; Di Luccia, A.; La Notte, E. Pesticide residues in tomato grown in open field. **Food Control**, v. 16, n.7, p. 629-632. 2005.
4. Hajslová, J.; Zrostlíková, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n.1-2, p. 181-197. 2003.
5. Pinho, G. P.; Silvério, F. O.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Starling, M. A. V. M. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatografia de agrotóxicos. **Química Nova**, v. 33, p. 909-913. 2010.
6. Picó, Y.; Blasco, C.; Font, G. Environmental and food applications of LC–tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: An overview. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 23, n.1, p. 45-85. 2004.
7. Shami, N. J. I. E.; Moreira, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 227-236. 2004.
8. Alvarenga, M. A. R. **Tomate: produção em campo, em casa- de- vegetação e em hidroponia** Lavras: 2004. 400 p.
9. Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O. Pesticide determination in tomatoes by solid-liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 121, n.1, p. 251-256. 2010.
10. Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O.; Marthe, D. B. Influence of tomato components in the quantification of four pesticides by gas chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society** v. 23, p. 294-300. 2012.

11. Sousa, F. A.; Costa, A. I. G.; Queiroz, M. E. L. R.; Teófilo, R. F.; Neves, A. A.; Pinho, G. P. Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA. **Food Chemistry**, v. 135, p. 179-185. 2012.
12. Camelo, A. F. L.; Gómez, P. A. Comparison of color indexes for tomato ripening. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n.3, p. 534-537. 2004.
13. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ed.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1020 p. p.
14. Nunes, I. L.; Mercadante, A. Z. Obtenção de cristais de licopeno a partir de descarte de tomate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n.3, p. 440-447. 2004.
15. Rodriguez-Amaya, D. B. **A Guide to Carotenoids Analysis in Food**. Washington: International Life Sciences Institute Press, 2001. 64 p.
16. Moraes, S. L.; Rezende, M. O. O.; Nakagawa, L. E.; Luchini, L. C. Análise de resíduos de pesticidas em tomates por cromatografia em camada delgada. **Química Nova**, v. 25, p. 196-202. 2002.
17. Chitarra, M. I. F.; Chitarra, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão, 1990. 293 p.
18. Zambrano, J.; Moyeja, J.; Pacheco, L. Efecto del estado de madurez en la composición y calidad de frutos de tomate. **Agronomía Tropical**, v. 46, n.1, p. 61-72. 1996.
19. Kluge, R. A.; Minami, K. Efeito de esters de sacarose no armazenamento de tomates Santa Clara. **Scientia Agrícola**, v. 54, n.1-2, p. 39-44. 1997.
20. Cliff, M.; Lok, S.; Lu, C.; Toivonen, P. M. A. Effect of 1-methylcyclopropene on the sensory, visual, and analytical quality of greenhouse tomatoes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 53, n.1-2, p. 11-15. 2009.
21. Ferreira, S. M. R.; Quadros, D. A. D.; Karkle, E. N. L.; Lima, J. J. D.; Tullio, L. T.; Freitas, R. J. S. D. Qualidade pós-colheita do tomate de mesa convencional e orgânico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 858-869. 2010.
22. Borguini, R. G.; Silva, M. V. D. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAS DO TOMATE (*Lycopersicon esculentum*) PRODUZIDO POR CULTIVO

ORGÂNICO EM COMPARAÇÃO AO CONVENCIONAL. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n.4, p. 355-361. 2005.

23. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: editora da UNICAMP, 2006. 456 p.

CONSIDERAÇÃO FINAL

O efeito de matriz em análises cromatográficas é um fator que deve ser levado em consideração, principalmente em análises de amostras complexas. Atualmente o estudo do efeito de matriz é incluído como figura de mérito em parâmetros de validação de métodos analíticos, devido à sua importância.

Os resultados obtidos neste estudo confirmam que o efeito de matriz depende de diversos fatores, dentre eles as características do agrotóxico e da matriz, mostrando que um mesmo agrotóxico apresenta diferentes respostas em diferentes matrizes.

Um fator importante avaliado foi o pH das amostras, após se observar que amostras ácidas provocavam efeito de matriz positivo na resposta dos agrotóxicos e amostras com pH em torno de 6,0 causaram diminuição na resposta dos agrotóxicos.

A realização desse trabalho foi muito importante no sentido de avaliar as características das amostras responsáveis pela alteração na resposta cromatográfica de agrotóxicos em diversas matrizes. Os resultados obtidos confirmam a necessidade de etapas no processo de preparo de amostras (*clean up*, preparo das curvas analíticas no extrato da matriz, etc.) que minimizem esse efeito, no sentido de garantir a confiabilidade dos resultados de uma análise.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Muitas pesquisas em relação ao efeito de matriz ainda podem ser realizadas com base nos resultados obtidos deste trabalho.

As propriedades dos agrotóxicos responsáveis pelas diferentes respostas cromatográficas em diferentes matrizes devem ser avaliadas.

A influência do pH da água utilizada no processo de extração das matrizes tomate, abacaxi e uva na resposta cromatográfica de agrotóxicos pode ser analisada, visto que a influência do pH da água no processo de extração foi avaliada para essas matrizes somente espectrofotometricamente.

Além disso, o uso do licopeno e do β -caroteno como protetores de analito pode ser avaliado no sentido de tentar reduzir o efeito de matriz.

ANEXOS

ANEXO A – Tabelas com as porcentagens de efeito de matriz utilizadas na Análise de Componentes Principais em todas as concentrações.

	Tomate	Batata	Água	Maçã	Abacaxi	Solo	Uva	
100 µg L ⁻¹	Clorotalonil	51,3	35,5	-10,0	27,4	105,9	-28,2	116,8
	Parationa metílica	7,6	-1,9	-7,2	9,6	6,5	-12,9	6,9
	Clorpirifós	14,2	-4,0	-4,1	15,1	-37,0	3,2	-12,2
	Procimidona	-4,1	-23,6	-9,6	15,1	-14,1	-12,1	-17,2
	Endossulfan	18,0	-5,2	-3,2	24,1	22,3	-11,6	19,1
	Iprodiona	20,3	-82,2	-69,6	-65,8	-58,9	-78,5	-70,8
	λ-cialotrina	46,8	-21,4	6,4	21,2	69,2	-16,4	162,8
	Permetrina	-4,1	-54,3	-40,6	-23,5	-50,3	-58,1	-26,4
	Cipermetrina	56,3	-62,2	-4,6	27,9	44,4	-74,0	188,6
	Deltametrina	112,1	42,6	23,0	55,6	106,7	-26,3	533,9
	Azoxistrobina	14,0	10,7	-2,8	5,7	-6,6	-37,2	83,6
150 µg L ⁻¹	Clorotalonil	34,25	16,90	-14,25	14,17	69,77	-28,39	78,92
	Parationa metílica	9,90	-4,62	-9,00	7,19	7,14	-13,90	5,17
	Clorpirifós	13,35	-5,12	-4,32	10,25	-30,04	-0,45	-7,30
	Procimidona	-7,70	-21,04	-6,02	11,37	-12,48	-9,64	-18,28
	Endossulfan	20,38	-6,55	-6,41	16,10	20,04	-8,33	16,89
	Iprodiona	11,67	-81,28	-70,34	-70,02	-56,04	-75,18	-72,02
	λ-cialotrina	47,22	-22,32	2,16	13,48	63,47	-16,18	135,20
	Permetrina	-1,87	-56,10	-39,12	-30,96	-48,75	-56,58	-34,77
	Cipermetrina	59,58	-63,43	-8,35	15,90	50,37	-58,79	157,58
	Deltametrina	101,47	29,78	12,86	38,58	114,70	-27,50	412,53
	Azoxistrobina	14,63	5,92	-5,30	3,23	-1,84	-34,56	65,54
300 µg L ⁻¹	Clorotalonil	20,85	1,69	-17,76	4,12	48,20	-28,61	52,48
	Parationa metílica	12,55	-7,65	-10,98	4,63	7,78	-15,02	3,36
	Clorpirifós	12,36	-6,43	-4,60	4,31	-21,64	-4,89	-1,35
	Procimidona	-12,06	-17,59	-1,22	6,65	-10,55	-6,69	-19,55
	Endossulfan	22,84	-7,98	-9,65	7,87	17,85	-5,01	14,62
	Iprodiona	3,65	-80,34	-71,05	-73,90	-53,02	-71,58	-73,30
	λ-cialotrina	47,68	-23,37	-2,12	5,45	58,24	-16,01	114,02
	Permetrina	0,86	-57,94	-37,47	-39,58	-47,00	-54,83	-43,72
	Cipermetrina	63,43	-64,72	-11,85	3,27	56,24	-43,48	132,76
	Deltametrina	91,41	17,88	4,55	21,86	122,36	-28,69	330,61
	Azoxistrobina	15,36	0,68	-7,90	0,41	3,77	-31,62	50,68

ANEXO A – Tabelas com as porcentagens de efeito de matriz utilizadas na Análise de Componentes Principais em todas as concentrações (Continuação).

	Tomate	Batata	Água	Maçã	Abacaxi	Solo	Uva	
400 µg L ⁻¹	Clorotalonil	17,93	-1,68	-18,54	1,98	44,10	-28,66	47,08
	Parationa metílica	13,26	-8,46	-11,50	3,97	7,94	-15,31	2,89
	Clorpirifós	12,09	-6,80	-4,68	2,62	-19,26	-6,17	0,34
	Procimidona	-13,29	-16,55	0,24	5,28	-10,02	-5,86	-19,91
	Endossulfan	23,46	-8,34	-10,47	5,79	17,30	-4,16	14,05
	Iprodiona	1,75	-80,10	-71,22	-74,82	-52,23	-70,63	-73,63
	λ-cialotrina	47,80	-23,65	-3,20	3,40	56,99	-15,97	109,47
	Permetrina	1,64	-58,41	-37,03	-41,95	-46,54	-54,35	-46,05
	Cipermetrina	64,49	-65,04	-12,69	0,01	57,69	-39,64	127,32
	Deltametrina	88,98	15,04	2,70	17,74	124,22	-28,98	314,12
	Azoxistrobina	15,55	-0,71	-8,57	-0,37	5,33	-30,84	47,37
500 µg L ⁻¹	Clorotalonil	16,25	-3,63	-18,99	0,75	41,82	-28,69	44,02
	Parationa metílica	13,70	-8,95	-11,81	3,56	8,04	-15,49	2,61
	Clorpirifós	11,92	-7,03	-4,73	1,56	-17,77	-6,98	1,40
	Procimidona	-14,06	-15,88	1,17	4,41	-9,68	-5,34	-20,13
	Endossulfan	23,84	-8,56	-10,95	4,53	16,98	-3,65	13,70
	Iprodiona	0,62	-79,95	-71,32	-75,36	-51,76	-70,06	-73,83
	λ-cialotrina	47,87	-23,82	-3,86	2,16	56,26	-15,95	106,86
	Permetrina	2,13	-58,69	-36,76	-43,43	-46,26	-54,05	-47,47
	Cipermetrina	65,16	-65,24	-13,19	-1,98	58,56	-37,34	124,17
	Deltametrina	87,54	13,36	1,63	15,27	125,33	-29,15	304,83
	Azoxistrobina	15,68	-1,55	-8,98	-0,86	6,30	-30,35	45,45