

ALINE MARIA TEIXEIRA

**Desenvolvimento de método para determinação de resíduos de
pesticidas em folhas desidratadas e infusão de chá verde**

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*.

Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz

Coorientadores: André Fernando de Oliveira

Fábio Junior Moreira Novaes

Viçosa - Minas Gerais

2024

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

T266d
2024
Teixeira, Aline Maria, 1993-
Desenvolvimento de método para determinação de resíduos
de pesticidas em folhas desidratadas e infusão de chá verde /
Aline Maria Teixeira. – Viçosa, MG, 2024.
1 tese eletrônica (102 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Química, 2024.

Referências bibliográficas: f. 42-46.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.517>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Camellia sisensis*. 2. Chá verde - Teor de pesticidas.
3. Chá verde - Preparo. 4. Chá verde - Amostragem.
5. Cromatografia a gás. 6. Espectrometria de massa. I. Queiroz,
Maria Eliana Lopes Ribeiro de, 1958-. II. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Química. Programa de
Pós-Graduação em Agroquímica. III. Título.

CDD 22. ed. 583.66

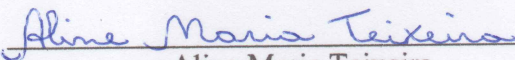
ALINE MARIA TEIXEIRA


**Desenvolvimento de método para determinação de resíduos de
pesticidas em folhas desidratadas e infusão de chá verde**

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: 23 de maio de 2024.

Assentimento:


Aline Maria Teixeira
Autora


Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz
Orientadora

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, pela orientação, ensinamentos, confiança e amizade.

Ao Prof. André Fernando de Oliveira, pelos ensinamentos e contribuições dadas para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Fábio Júnior Moreira Novaes pelo seu apoio e contribuições neste trabalho.

A todos Laquarianos, em especial aos amigos, Jéssika, Vitor, Liany, Alessandra, Thais, Mariane, Mayara, Marcos e Carol pela amizade, acolhimento, pelos momentos de descontração, boa convivência e pela ajuda nos estudos.

Aos membros da banca examinadora que consentiram em participar da avaliação deste trabalho de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Viçosa, o Programa de pós-graduação em Agroquímica do Departamento de Química, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a Deus por me abençoar com saúde, força e discernimento que me fizeram chegar até aqui.

Expresso minha profunda gratidão a meus pais, José de Assis e Imaculada, por confiarem em mim e por me concederem esta oportunidade de completar mais uma etapa importante da minha jornada. A eles, além desta conquista, dedico minha vida com carinho e reconhecimento.

Aos meus irmãos, Áurea e Édson, que compartilharam meu sonho e me encorajaram a seguir em frente.

Aos meus sobrinhos Maria Alice, Gustavo e Antônio por toda alegria e carinho.

Aos meus amigos de longa data, Josiane, Claudinéia, Valdeir, Mayara e Igor, muito obrigada por todo carinho, confiança, apoio e amizade incrível de cada um de vocês!

RESUMO

TEIXEIRA, Aline Maria, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, 23 de maio de 2024.
Desenvolvimento de método para determinação de resíduos de pesticidas em folhas desidratadas e infusão de chá verde. Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.
Coorientadores: André Fernando de Oliveira e Fábio Junior Moreira Novaes.

O chá verde (*Camellia sinensis*) é uma das bebidas tradicionais mais consumidas devido às suas propriedades medicinais, aroma e sabor. No entanto, sua cultura é frequentemente ameaçada por pragas, doenças e diversas espécies de ervas daninhas, tornando o uso de pesticidas uma necessidade para manter a produtividade. Com o objetivo de controlar a qualidade e proteger a saúde dos consumidores, a União Europeia estabeleceu Limite Máximos de Resíduos (LMR) para os pesticidas nas folhas de chá. No entanto, é importante destacar que o chá verde não é consumido diretamente, mas as suas folhas são submetidas à infusão em água quente. Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver métodos analíticos apropriados para determinar resíduos de pesticidas em folhas de chá verde e em sua infusão, bem como avaliar a transferência desses pesticidas para a infusão. Esse estudo foi dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo, a técnica extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) foi otimizada e validada para a determinação de resíduos de pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina em amostras de folhas desidratadas de chá verde, utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS). O método apresentou valores de recuperação de 81 a 111%, coeficiente de variação (CV) < 16% e limite de quantificação (LQ) de 0,050 mg kg⁻¹ para todos os analitos. O método otimizado e validado foi aplicado em amostras de chá verde, sendo detectada a presença da bifentrina em duas amostras em concentrações inferiores ao LMR. O método foi testado também para avaliar a presença de resíduos de pesticidas em outros tipos de chás, sendo detectados resíduos dos pesticidas pirimifós-metílico e ciproconazol em concentrações superiores ao LMR em algumas amostras. No segundo capítulo o método extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP) foi otimizado e validado para determinação dos pesticidas (pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina) na infusão de chá verde. O método apresentou porcentagem de recuperação de 86,0 - 102 %, CV inferior a 17,8 e LQ de 0,0125 mg L⁻¹. O método desenvolvido foi aplicado em amostras de infusões de folhas de chá verde não sendo detectados resíduos dos pesticidas investigados nessas amostras. Esse método foi então aplicado para avaliar a taxa de transferência dos pesticidas pirimifós-metílico,

ciproconazol e bifentrina das folhas de chá verde para infusão preparada em diferentes temperaturas e tempos. Somente a temperatura foi significativa ($p < 0,05$). Nas temperaturas de infusão de 100 °C e 80 °C a translocação do ciproconazol para a infusão foi de 65,0% e 50,6%, a do pirimifós-metílico foi de 23,5% e 11,7% e a da bifentrina foi de 3,79% e inferior ao LQ respectivamente. Os métodos SLE/LTP e LLE/LTP otimizados e validados se mostraram adequados para determinação de resíduos de pesticidas em folhas de chá verde e em sua infusão. Os resultados obtidos neste trabalho mostram a importância de se monitorar a presença de resíduos de pesticidas em chás e de se ter no Brasil uma legislação mais específica para o seu consumo diário.

Palavras-chave: *Camellia sisensis*; Preparo de amostra; Resíduos de pesticidas; Cromatografia gasosa; Espectrometria de massas.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Aline Maria, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2024. **Development of a method for determining pesticide residues in dehydrated leaves and green tea infusion.** Adviser: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-advisers: André Fernando de Oliveira and Fábio Junior Moreira Novaes.

Green tea (*Camellia sinensis*) is one of the most traditionally consumed beverages due to its medicinal properties, aroma, and flavor. However, its cultivation is frequently threatened by pests, diseases, and various weed species, making pesticide use necessary to maintain productivity. To control quality and protect consumer health, the European Union has established Maximum Residue Limits (MRLs) for pesticides in tea leaves. It is important to note that green tea is not consumed directly, but its leaves are subjected to infusion in hot water. Therefore, the objective of this study was to develop appropriate analytical methods for determining pesticide residues in green tea leaves and their infusion, as well as to assess the transfer of these pesticides into the infusion. This study was divided into two chapters. In the first chapter, the low-temperature solid-liquid extraction with partitioning (SLE/LTP) technique was optimized and validated for the determination of residues of pirimiphos-methyl, flutriafol, cyproconazole, and bifenthrin in dehydrated green tea leaf samples using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The method showed recovery values ranging from 81% to 111%, a coefficient of variation (CV) < 16%, and a quantification limit (LQ) of 0.050 mg kg⁻¹ for all analytes. The optimized and validated method was applied to green tea samples, detecting bifenthrin in two samples at concentrations below the MRL. The method was also tested to assess pesticide residue presence in other types of tea, where residues of pirimiphos-methyl and cyproconazole were detected at concentrations exceeding the MRL in some samples. In the second chapter, the low-temperature liquid-liquid extraction (LLE/LTP) method was optimized and validated for determining pesticides (pirimiphos-methyl, flutriafol, cyproconazole, and bifenthrin) in green tea infusions. The method demonstrated recovery percentages of 86.0% - 102%, a CV below 17.8, and an LQ of 0.0125 mg L⁻¹. The developed method was applied to green tea infusion samples, and no residues of the investigated pesticides were detected in these samples. This method was then used to evaluate the transfer rate of pirimiphos-methyl, cyproconazole, and bifenthrin from green tea leaves to infusions prepared at different temperatures and times. Only temperature was significant (p < 0.05). At infusion temperatures of 100 °C and 80 °C, the translocation of cyproconazole to the infusion was 65.0% and 50.6%, pirimiphos-methyl was 23.5% and

11.7%, and bifenthrin was 3.79% and below the LQ, respectively. The optimized and validated SLE/LTP and LLE/LTP methods were suitable for determining pesticide residues in green tea leaves and their infusion. The results obtained in this work highlight the importance of monitoring pesticide residues in teas and the need for more specific legislation in Brazil for daily consumption.

Keywords: *Camellia sisensis*; Sample preparation; Pesticide residues; Gas chromatography; Mass spectrometry.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 1	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo geral.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Preparo de solução-padrão e Reagentes	25
3.2. Equipamentos.....	26
3.3. Condições Cromatográficas	26
3.4. Amostras de chá.....	26
3.5. Remoção de clorofila por d-SPE de extratos obtidos de folhas de chá verde por SLE/LTP.....	27
3.5.1. Processo de extração.....	27
3.5.2. Remoção de clorofila dos extratos de folha de chá verde obtidos da SLE/LTP (<i>Clean-up</i>).....	27
3.5.3. Seleção de sorvente para d-SPE	27
3.5.4. Otimização das proporções entre os sorventes	28
3.5.5. Estudo da retenção dos analitos pelos sorventes	28
3.5.6. Otimização da técnica dispersão em fase sólida (d-SPE).....	28
3.6. Fortificação das amostras de folha de chá verde	29
3.7. Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP)	30
3.7.1. Extração dos pesticidas por SLE/LTP – Técnica geral	30
3.7.2. Otimização da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP)	30
3.7.3. Otimização dos parâmetros volume de água, volume do solvente extrator e a força iônica na SLE/LTP	30
3.7.4. Otimização dos parâmetros tempo de agitação, centrifugação e congelamento para SLE/LTP	31
3.8. VALIDAÇÃO DO MÉTODO SLE/LTP.....	32
3.8.1. Seletividade	33
3.8.2. Limite de quantificação e limite de detecção	33

3.8.3.	Linearidade do método	33
3.8.4.	Exatidão	33
3.8.5.	Precisão.....	34
3.8.6.	Repetitividade.....	34
3.8.7.	Precisão intermediária	34
3.8.8.	Efeito de matriz	34
3.9.	Aplicação do método.....	35
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1.	Análise cromatográfica	35
4.2.	Remoção clorofila das folhas de chá verde (<i>Clean-up</i>).....	37
4.2.1.	Otimização dos sorventes	37
4.2.2.	Otimização da proporção entre os sorventes	40
4.2.3.	Otimização da técnica dispersão em fase sólida (d-SPE).....	41
4.3.	Otimização da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) para determinação de resíduos de pesticidas das folhas de chá verde.....	43
4.3.1.	Otimização do volume de água, volume de acetonitrila e força iônica na SLE/LTP.....	43
4.3.2.	Otimização do tempo de agitação, centrifugação e congelamento.....	50
4.4.	Validação do método SLE/LTP	54
4.4.1.	Seletividade	54
4.4.2.	Limite de detecção e limite de quantificação	56
4.4.3.	Linearidade do método	56
4.4.4.	Exatidão	57
4.4.5.	Precisão.....	57
4.4.6.	Repetitividade.....	58
4.4.7.	Precisão intermediária	58
4.4.8.	Efeito de matriz	59
4.5.	Aplicação do método.....	59
5.	CONCLUSÕES.....	60
6.	REFERÊNCIAS	61
CAPÍTULO 2.....	67	
1. INTRODUÇÃO	68	
2. OBJETIVOS	70	

2.1.	Objetivo geral.....	70
2.2.	Objetivos específicos	70
3.	MATERIAL E MÉTODOS	71
3.1.	Princípios ativos e soluções padrão	71
3.2.	Equipamentos.....	71
3.3.	Condições Cromatográficas	71
3.4.	Amostras de chá para a infusão	72
3.5.	Preparo e fortificação das amostras de infusão de chá verde.....	73
3.6.	Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP).....	73
3.6.1.	Extração dos pesticidas por (LLE/LTP) - Técnica geral	73
3.6.2.	Otimização da técnica de LLE-LTP	73
3.6.3.	Otimização dos parâmetros volume de amostra, volume do solvente extrator e força iônica na LLE/LTP-GC-MS	74
3.6.4.	Otimização do tempo de agitação e congelamento para LLE/LTP	75
3.7.	Validação do método LLE/LTP-GC-MS.....	75
3.8.	Aplicação do método LLE/LTP-GC-MS em amostras comerciais	77
3.9.	Fortificação das folhas de chá verde para estudo de transferência	77
3.10.	Quantificação dos pesticidas presentes nas folhas de chá.....	77
3.11.	Estudo da transferência dos pesticidas das folhas de chá verde para as infusões	78
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.1.	Análise cromatográfica	78
4.2.	Otimização do método LLE/LTP-MS para determinação de resíduos de pesticidas em infusão de chá.....	80
4.2.1.	Otimização dos parâmetros volume de amostra, volume de solvente extrator e força iônica.....	80
4.2.2.	Otimização do tempo de agitação e congelamento	85
4.3.	Validação do método LLE/LTP	88
4.4.	Aplicação do método LLE/LTP-GC-MS em amostras comerciais	93
4.5.	Estudo da transferência dos pesticidas das folhas de chá verde para as infusões	93
5.	CONCLUSÃO.....	96
6.	REFERÊNCIAS	98
	CONCLUSÃO GERAL	101

INTRODUÇÃO GERAL

Os chás se tornaram muito populares desde seu surgimento nos países asiáticos, espalhando assim para outras partes do mundo, levando então a um aumento de sua produção e exportação. Atualmente, o chá tem sido uma das bebidas mais consumidas em todo mundo (HASSAN, 2019).

Um chá muito utilizado devido a seus benefícios é o chá verde (*Camellia sinensis*), sendo um ótimo aliado à saúde humana podendo ajudar na prevenção de doenças devido a ampla gama de polifenóis antioxidantes, que desempenham vários papéis na melhoria da saúde humana. Os chás podem ter efeito anti-inflamatório (SOUZA *et al.*, 2020), reduzir o risco de diabetes (AMORIM *et al.*, 2018), osteoporose (SHEN *et al.*, 2011) e doenças cardiovasculares (KURIYAMA *et al.*, 2006). Acredita-se que os chás também tenham alguns efeitos anticancerígenos (CHENG *et al.*, 2020).

Tais benefícios levaram ao aumento do consumo de chás que está diretamente relacionado à busca de estilos de vida mais saudáveis e à tentativa de diminuir a quantidade de fármacos usados para tratar doenças. Conseqüentemente, ocorreu também o aumento da produção de chás em todo o mundo. Porém, como esta planta é suscetível a uma grande variedade de pragas, ervas daninhas e doenças, tem se observado o aumento do uso de pesticidas para controlar essas pragas durante o cultivo e armazenamento, (SOLTANI & SERESHTI, 2022).

Os pesticidas são muito conhecidos por suas propriedades letais que são amplamente utilizadas para controlar pragas e estabilizar a produção agrícola. No entanto, se usado de forma indiscriminada, esses compostos podem apresentar alguns problemas ambientais e de saúde que não devem ser ignorados (MIR *et al.*, 2022). Alguns desses pesticidas podem gerar problemas de intoxicação em humanos que ocorrem devido a ingestão contínua destes produtos, quando presentes em água e alimentos contaminados. Muitos desses compostos foram proibidos devido ao seu efeito acumulativo e prejudicial que ocorre pela transferência de poucas quantidades ao longo da cadeia alimentar (CARVALHO, 2006).

A presença de resíduos em alimentos acaba sendo uma via de exposição com possíveis efeitos agudos ou crônicos à saúde (CALDERÓN *et al.*, 2022). Vários relatos indicam o risco por trás da ingestão de diferentes pesticidas e a exposição contínua causa depressão e déficits neurológicos, diabetes, doenças respiratórias e, em casos extremos causa câncer, morte fetal e aborto espontâneo (NTZANI *et al.*, 2013).

Portanto, avaliar a qualidade dos alimentos que estão sendo oferecidos para a população, caracterizar as possíveis fontes de contaminação, monitorar o uso não autorizado de pesticidas e o uso inadequados dos demais, incentivar o uso de Boas Práticas Agrícolas (BPA) em diferentes tipos de culturas tem se tornado indispensável (ANVISA, 2019).

Resíduos de pesticidas presentes em folhas de chá secas podem ser transferidos para a infusão (chá pronto), tornando assim o chá uma fonte significativa de exposição humana aos pesticidas. Portanto, é importante avaliar a transferência percentual de resíduos de pesticidas das folhas de chá para sua infusão, uma vez que o chá é submetido a esse processo antes do consumo humano (CHO *et al.*, 2014).

Em função disso, monitorar a presença de resíduos de pesticidas nessa matriz, tanto nas folhas como em sua infusão se torna uma necessidade para garantir o consumo de alimentos seguros. Portanto, é essencial desenvolver métodos de extração que sejam simples e eficazes na detecção de resíduos de pesticidas em chá verde. Um procedimento que tem demonstrado sucesso para essa finalidade é a extração sólido-líquido (SLE) e líquido-líquido (LLE) com partição em baixa temperatura (LTP). Essa abordagem apresenta vantagens, como o uso reduzido de solventes e a eliminação de etapas de purificação na preparação da amostra em algumas matrizes (GOULART *et al.*, 2008).

Diante da necessidade e importância de se desenvolver métodos de extração simples e eficientes para monitorar e determinar resíduos de pesticidas em folhas de chá verde e em chá pronto (infusão), esse trabalho teve como objetivo: (i) desenvolver e validar o método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LPT) para determinação de resíduos de pesticidas em folha de chá verde desidratadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), (ii) desenvolver e validar o método de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LPT) para determinação de resíduos de pesticidas em chá pronto (infusão) por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) e avaliar a transferência de pesticidas das folhas desidratadas para a sua infusão em diferentes condições de preparo.

Neste sentido, esse trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo o primeiro denominado “Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura, uma alternativa para determinação de resíduos de pesticidas em chás”. Este capítulo gerou um artigo intitulado “Solid-liquid extraction with low-temperature partitioning as an alternative to determinate pesticides residues in teas” (<https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20240165>). O

segundo capítulo foi denominado “Análise de resíduos de pesticidas em folhas e infusões de chá verde e avaliação de sua transferência para a infusão”.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, L. M. N., VAZ, S. R., CASÁRIO, G., COELHO, A. S. G., BOTELHO, P. B. Effect of green tea extract on bone mass and body composition in individuals with diabetes. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 589–594, 2018.
- ANVISA. Programa de análise de resíduos de agróxicos em alimentos (PARA). Relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018 e Primeiro ciclo do plano plurianual 2017-2020. **Diário oficial da União**; Poder executivo, Brasília, DF, de 10 de dezembro de 2019. p. 1–136, 2019.
- CALDERON, R., GARCÍA-HERNANDEZ, J., PALMA, P., LEYVA-MORALES, J. B., ZAMBRANO-SORIA, M., BASTIDAS-BASTIDAS, P. J., GODOY, M. Assessment of pesticide residues in vegetables commonly consumed in Chile and Mexico: Potential impacts for public health. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 108, p. 104420, 2022.
- CARVALHO, F. P. Agriculture, pesticides, food security and food safety. **Environmental Science & Policy**, v. 9, p. 685–692, 2006.
- CHENG, Z., ZHANG, Z., HAN, Y., WANG, J., WANG, Y., CHEN, X., SHAO, Y., CHENG, Y., ZHOU, W., LU, X., WU, Z. A review on anti-cancer effect of green tea catechins. **Journal of Functional Foods**, v. 74, p. 104172, 2020.
- CHO, S. K., ABD EL-ATY, A. M., RAHMAN, M. M., CHOI, J. H., & SHIM, J. H. Simultaneous multi-determination and transfer of eight pesticide residues from green tea leaves to infusion using gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 165, p. 532-539, 2014.
- GOULART, S. M., QUEIROZ, M. E. L. R., NEVES, A. A., QUEIROZ, J. H. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1320–1323, 2008.
- HASSAN, M. M., LI, H., AHMAD, W., ZAREEF, M., WANG, J., XIE, S., WANG, P., OUYANG, Q., WANG, S., CHEN, Q. Au@Ag nanostructure-based SERS substrate for simultaneous determination of pesticides residue in tea via solid phase extraction coupled multivariate calibration. **LWT**, v. 105, p. 290–297, 2019.

KURIYAMA, S., SHIMAZU, T., OHMORI, K., KIKUCHI, N., NAKAYA, N., NISHINO, Y., TSUBONO, Y., TSUJI, I. Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: The Ohsaki study. **Journal of the American Medical Association**, v. 296, n. 10, 2006.

MIR, S. A., DAR, B. N., MIR, M. M., SOFI, S. A., SHAH, M. A., SIDIQ, T., SUNOOJ, K. V., HAMDANI, A. M., KHANEGHAH, A. M. Current strategies for the reduction of pesticide residues in food products. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2022.

NTZANI, E. E., CHONDROGIORGI, M., NTRITSOS, G., EVANGELOU, E., TZOULAKI, I. Literature review on epidemiological studies linking exposure to pesticides and health effects. **EFSA Supporting Publications**, v. 10, n. 10, 2013.

SHEN, C.-L., YEH, J. K., CAO, J., J., CHYU, M.-C., WANG, J.-S. Green tea and bone health: Evidence from laboratory studies. **Pharmacological Research**, v. 64, n. 2, p. 155–161, 2011.

SOLTANI, S.; SERESHTI, H. A green alternative QuEChERS developed based on green deep eutectic solvents coupled with gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of pesticides in tea samples. **Food Chemistry**, v. 380, p. 132181, 2022.

SOUZA, N. C., NASCIMENTO, E. N. O., OLIVEIRA, I. B., OLIVEIRA, H. M. L., SANTOS, E. G. P., MATA, M. E. R. M. C., GELAIN, D. P., MOREIRA, J. C. F., DALMOLIN, R. J. S., PASQUALI, M. A. B. Anti-inflammatory and antioxidant properties of blend formulated with compounds of *Malpighia emarginata* D.C (acerola) and *Camellia sinensis* L. (green tea) in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 128, p. 110277, 2020.

CAPÍTULO 1

EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA, UMA ALTERNATIVA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM CHÁS

RESUMO

Neste trabalho foi otimizado e validado um método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) para determinar resíduos de pesticidas (pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol, bifentrina) em folhas de chá verde desidratadas. Após a partição em baixa temperatura, o extrato em acetonitrila foi submetido a uma etapa de *clean-up* utilizando extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) para remoção de clorofila. O método foi validado e os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), exatidão, precisão e efeito de matriz. Os resultados indicaram que o método SLE/LTP-GC-MS é eficiente para a extração dos analitos nas amostras de folha de chá verde mostrando-se seletivo e sensível com LD e LQ de 0,015 mg kg⁻¹ e 0,050 mg kg⁻¹, respectivamente. A recuperação dos analitos foi obtida na faixa de 81 - 111% com coeficientes de variação inferiores a 16% e com coeficiente de determinação (R²) acima de 0,990. O método otimizado e validado foi aplicado em amostras de chá verde, e em outras 13 variedades de chás obtidas da região Sudeste e Sul do Brasil, totalizando 43 amostras. Os pesticidas, em estudo, foram detectados em algumas amostras de chás, com valores acima do LMR permitido pela União Europeia. Esses resultados mostram que o método desenvolvido, SLE/LTP-GC-MS, pode ser aplicado como uma alternativa eficaz para determinação de resíduos em pesticidas em chás.

1. INTRODUÇÃO

Um chá muito consumido é da *Camellia sinensis*, uma planta muito importante economicamente, com efeitos positivos à saúde e sabor agradável. A infusão das folhas dessa planta está entre as bebidas mais consumidas em todo o mundo (PINTO, 2013). Esse chá é classificado em três tipos básicos: preto, oolong e verde, onde estes se diferenciam pelo beneficiamento da folha. O chá preto é preparado através da fermentação das folhas. O chá oolong passa por processo de fermentação mais fraco, levando a um aroma menos acentuado do que o preto. Já o chá verde, as folhas são apenas escaldadas e fervidas de modo a garantir a preservação de sua cor. Esse último é o mais rico em compostos com atividades funcionais (CHENG, 2006).

A composição das folhas de chá é complexa, incluindo diversas classes de compostos fenólicos ou flavonóides, como flavonóis e ácidos fenólicos, além de cafeína, pigmentos, carboidratos, aminoácidos e certos micronutrientes como as vitaminas B, E, C e minerais como o cálcio, magnésio, zinco, potássio e ferro (SENGER, SCHWANKE & GOTTLIEB, 2010).

O chá verde é muito conhecido não apenas por seu sabor marcante e aroma singular, mas também por seus vários benefícios à saúde (CHACKO *et al.*, 2010). A cafeína por exemplo é um composto muito eficaz contra a obesidade, as catequinas têm efeito de eliminação de radicais livres e antioxidantes, já os aminoácidos têm efeito de relaxamento e sedação (XU *et al.*, 2021). O chá possui também outros benefícios por ser anticancerígeno, antioxidante e anti-inflamatório, reduzir o colesterol, a pressão arterial e o risco de doenças cardiovasculares (KHAN & MUKHTAR, 2007; CHACKO *et al.*, 2010; NIE & XIE 2011), especialmente hipertensão (FANG *et al.*, 2019; MAHDAVI-ROSHAN *et al.*, 2020).

Devido a todos os benefícios oferecidos pelo chá verde, tem ocorrido um aumento do consumo do mesmo e vários pesticidas têm sido amplamente usados com o objetivo de proteger o cultivo de certos organismos alvo, garantindo assim a quantidade e qualidade da produção de chá. Entretanto, o uso em excesso desses pesticidas pode causar danos ao meio ambiente e à saúde humana (CHO *et al.*, 2014).

Tendo em vista esses problemas, com o objetivo de proteger a saúde da população, vários países começaram a monitorar o nível de resíduos de pesticidas em vários alimentos e bebidas, incluindo o chá, de maneira a evitar a venda de produtos que excedam um determinado valor estabelecido, o qual é denominado de limite máximo de resíduos (LMR).

No Brasil, a Farmacopeia Brasileira é reconhecida como o conjunto normativo oficial para produtos farmacêuticos. Seu propósito fundamental é definir os padrões essenciais de qualidade para medicamentos e demais preparações utilizadas na área da saúde. Esta farmacopeia, vinculada à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece LMR para pesticidas em plantas utilizadas com fins terapêuticos, como o chá verde. Esses limites são expressos em mg kg^{-1} e são definidos para garantir a segurança e a eficácia dos produtos consumidos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2019).

Por outro lado, a União Europeia estabelece LMR para uma gama muito mais ampla de pesticidas e seus metabólitos, abrangendo centenas de substâncias em produtos à base de chá. Essas regulamentações são projetadas para assegurar que os níveis de resíduos sejam mantidos dentro de limites rigorosos para proteger a saúde pública e garantir a segurança dos consumidores (EUROPEAN COMMISSION, 2023).

Nos últimos anos tem surgido diversos estudos indicando a presença de resíduos de pesticidas em chá verde, alguns excedem o LMR permitido pelos órgãos reguladores. Ly *et al.*, 2022, analisaram amostras de vários chás, entre eles chá verde e constataram que 71,1 % das amostras continham algum tipo de pesticidas, alguns acima do LMR permitido segundo a União Europeia. Huang *et al.*, 2019, determinaram a presença de pesticidas em chá verde, e os resultados mostraram que 67% das amostras continham algum tipo de pesticidas e muitos destes em concentrações acima do LMR permitido pela União Europeia. Esses estudos mostram a necessidade de monitorar resíduos em chá e de desenvolver métodos analíticos confiáveis, robustos e sensíveis para determinação de resíduos de pesticidas nessa matriz.

Muitos estudos têm sido conduzidos, atualmente, para determinar resíduos de pesticidas em amostras de chá por cromatografia líquida (SONG *et al.*, 2022) e gasosa (HUO *et al.*, 2016). Entretanto, a extração de resíduos de pesticidas, de amostras de chá, de forma efetiva, é um desafio. Por se tratar de uma matriz extremamente complexa, contendo não apenas cafeína, mas também pigmentos, polifenóis, entre outros, a sua análise se torna um desafio analítico (RETO *et al.*, 2007).

Várias técnicas já foram utilizadas para determinação de resíduos de pesticidas em chá, como a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) (CAO *et al.*, 2015), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (Moinfar & Hosseini, 2009), QuEChERS (rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro) (SHOEIBI *et al.*, 2013), extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) (ZHANG *et al.*, 2010; CHENG *et al.*, 2014), soxhlet (FIEDLER, CHEUNG & WONG, 2002). Esta última é uma técnica cara que exige grande quantidade de amostra e

solventes orgânicos de alta qualidade. Recentemente as técnicas de resíduos de pesticidas em alimentos e vegetais tem passado por constante evolução em termos de melhoria de extração, simplicidade, eficiência e redução do consumo de solventes. O desenvolvimento de métodos de baixos custo, rápidos e que gere menos contaminação ambiental é, portanto, uma exigência necessária (KRISTENSON, BRINKMAN & RAMOS, 2006; VÁZQUEZ *et al.*, 2019).

Neste contexto, uma técnica que têm se mostrado eficaz para determinação de resíduos de pesticidas em diversas matrizes é a extração com partição em baixa temperatura (LTP). A LTP apresenta vantagens como eficácia, simplicidade devido ao número reduzido de etapas, baixo custo pelo emprego de menor quantidade de solvente orgânico e de amostra, além de ser ambientalmente amigável, uma vez que atende aos critérios da química verde (GOULART *et al.*, 2008).

Este método se baseia na diferença do coeficiente de partição dos analitos entre uma matriz (sólida - SLE/LTP, ou líquida LLE/LTP) e uma fase constituída por água e um solvente orgânico miscível em água à temperatura ambiente. Ao submeter a amostra a baixas temperaturas, como -20 °C, tanto a fase aquosa quanto a matriz sólida congelam e precipitam, separando-se do sobrenadante constituído pelo solvente orgânico e os compostos de interesse. A água solidificada funciona como barreira física para partículas, possivelmente presentes em amostras líquidas ou que constituam amostras sólidas, impedindo a sua movimentação para a fase orgânica, promovendo simultaneamente à extração e a limpeza do extrato (LIU *et al.*, 2024).

O método (SLE/LTP) consiste em colocar uma certa quantidade da amostra sólida em contato com uma pequena quantidade de água e um solvente extrator que seja miscível e menos denso que a água, e líquido à temperatura ambiente. Alguns solventes que podem ser empregados nesta etapa são acetonitrila, acetato de etila, metanol e acetona. Em seguida, a mistura é agitada, centrifugada e levada ao freezer. Nesta etapa, a fase aquosa e a amostra congelam, ficando na parte inferior do recipiente utilizado e o solvente contendo os pesticidas extraídos ficam na fase superior. A fase superior é recolhida e analisada por cromatografia (GOULART *et al.*, 2008).

Em alguns casos, a complexidade da composição da matriz gera dificuldade para a quantificação dos pesticidas, sendo necessária a realização de uma etapa de limpeza (*clean-up*) do extrato, após a extração. Esta etapa é de extrema importância, uma vez que reduz as interferências e o efeito de matriz, além de diminuir a necessidade de manutenção técnica do sistema cromatográfico (PRESTES *et al.*, 2009).

A análise de resíduos de pesticidas em chás é um desafio devido a esse efeito de matriz, consequência do alto teor de polifenóis do chá, luteína e clorofila (CAO *et al.*, 2015). Entre estes, a clorofila tem o maior efeito adverso nos sistemas de cromatografia gasosa (GC) devido às suas características não voláteis. Quando uma amostra contendo clorofila é injetada em um GC, a clorofila não se volatiliza podendo se acumular no insert ou liner do injetor e também na coluna, formando novos sítios ativos e afetando o desempenho da análise. Portanto é essencial remover a clorofila antes da análise cromatográfica (MOL *et al.*, 2007; RAJSKI *et al.*, 2013).

Para a etapa de limpeza, a técnica extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) tem sido utilizada com bastante frequência. Nesta, uma alíquota do extrato é adicionada a uma pequena quantidade de sorvente, o qual remove os coextrativos da matriz. A d-SPE tem vantagens por ser um método de limpeza simples, rápido e permite o uso de pequenas quantidades de sorventes, quando comparada à SPE, além de ser possível a combinação de diferentes tipos de sorventes, de acordo com a necessidade de remoção de interferentes (BORGES *et al.*, 2015). A d-SPE é apropriada para a triagem de resíduos em várias matrizes, incluindo o chá. Muitos tipos de sorventes de d-SPE (simples ou mistos) como amina primária secundária (PSA), octadecil (C18) e negro de fumo grafitado (GCB) têm sido muito aplicados para chá (LU *et al.*, 2010; STEINIGER *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2012; LOZANO *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014).

A capacidade da SLE/LTP em reduzir a concentração de interferentes e a limpeza aprimorada oferecida pela d-SPE permite que a partir da associação destas duas técnicas sejam gerados extratos relativamente mais puros (WEN LIU *et al.*, 2024).

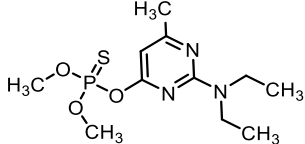
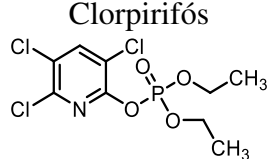
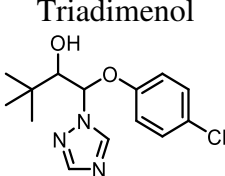
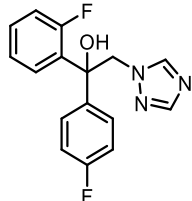
Após o preparo da amostra, é necessário o emprego de uma técnica instrumental para análise de pesticidas. As técnicas mais utilizadas para análise de resíduo em chá verde são a cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC) devido a facilidade de executar as separações, identificar e quantificar os analitos presentes na amostra com baixos limites de detecção (LD), de quantificação (LQ) e boa precisão (LI *et al.*, 2012; FAN *et al.*, 2013; HAYWARD *et al.*, 2013; HAYWARD, WONG & PARK, 2015; HOU *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2022; SOLTANI & SERESHTI, 2022).

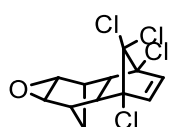
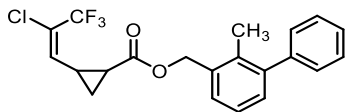
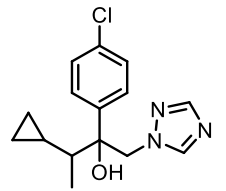
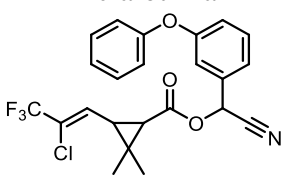
Dada a importância de desenvolver técnicas de extração eficientes e simplificadas para monitorar e identificar resíduos de pesticidas em folha de chá verde, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um método utilizando a técnica SLE/LTP associada à d-SPE para

determinação de resíduos de pesticidas em amostras de folhas desidratadas de chá verde, empregando GC-MS.

Os pesticidas selecionados para estudo, que são autorizados de acordo com a União Europeia para o controle de doenças e pragas na cultura de chá verde, são: pirimifos-metílico, clorpirifós, triadimenol, flutriafol, dieldrin, ciproconazol, bifentrina, λ -cialotrina. Na Tabela 1, são apresentados os compostos escolhidos para estudo com algumas de suas propriedades físico-químicas e seus respectivos LMR segundo a União Europeia.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos pesticidas pirimifos-metil, clorpirifós, triadimenol, flutriafol, dieldrin, bifentrina, ciproconazol e λ -cialotrina e seus grupo/classe química, classe toxicológica e limites máximos de resíduos (LMR) de acordo com a União Europeia.

Composto	LMR ^a / mg kg ⁻¹	Grupo químico/Classe	Classe toxicológica	Massa molecular /g mol ⁻¹	Log Kow ^b	Solubilidade ^c /mg L ⁻¹	Ponto de Ebulição ^d /°C
Pirimifós-metílico 	0,05	Organofosforado/ Inseticida, acaricida	Classe III	305,33	4,2	11	386,5 ± 52,0
Clorpirifós 	0,05	Organofosforado/ Inseticida	Classe III	350,58	4,7	1,05	375,9 ± 52,0
Triadimenol 	0,05	Triazol/Fungicida	Classe II	295,78	3,18	72	465,4 ± 55,0
Flutriafol 	0,05	Triazol/Fungicida	Classe III	301,29	2,3	95	506,5 ± 60,0

<p>Dieldrin</p> 	0,05	Organoclorado/ Inseticida	Classe III	380,91	3,7	0,14	416,2 ± 45,0
<p>Bifentrina</p> 	30	Piretróide/Inseticida, acaricida	Classe III	422,88	6,6	0,001	453,2 ± 45,0
<p>Ciproconazol</p> 	0,05	Triazol/Fungicida	Classe III	291,78	3,09	93	476,9 ± 55,0
<p>λ-cialotrina</p> 	0,05	Piretróide/Inseticida	Classe III	449,85	6,8	0,004	498,9 ± 45,0

^aLimite máximo de Resíduo (LMR) de acordo com a União Europeia; ^bcoeficiente de partição octanol-água a pH 7 e 20 °C; ^cem água a 20 °C; ^da 760 mmHg. Fonte: IUPAC, 2023; União Europeia, 2023.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Desenvolver um método utilizando a técnica extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) associada à dispersão de matriz em fase sólida (d-SPE) para determinação de resíduos de pesticidas em folhas de chá verde desidratadas por cromatografia gasosa.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar as condições cromatográficas para análise de resíduos de pesticidas por GC-MS;
- Otimizar a técnica d-SPE para remoção de clorofila do extrato obtido da SLE/LTP;
- Otimizar a extração dos pesticidas em amostras de folha de chá verde desidratadas utilizando a SLE/LTP;
- Validar o método (SLE/LTP-GC-MS) otimizado;
- Aplicar o método otimizado e validado para determinar resíduos de pesticidas em chás comercializados nas regiões Sudeste e Sul do Brasil.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparo de solução-padrão e Reagentes

Os seguintes padrões analíticos dos pesticidas pirimifós-metílico (pureza = 99,5% m/m, Sigma-Aldrich), clorpirifós (pureza = 99,0% m/m, Sygenta), triadimenol (pureza = 99,0% m/m, Dr. Ehrenstorfer GmbH), flutriafol (pureza = 97,0% m/m, Sigma-Aldrich), dieldrin (pureza = 99,8%, Sigma-Aldrich), ciproconazol (pureza = 99,8%, Sigma-Aldrich), bifentrina (pureza = 92,2% m/m, FMC), λ -cialotrina (pureza = 95,0% m/m, Sigma-Aldrich), foram empregados neste estudo.

Foram preparadas soluções-estoque dos padrões de cada pesticidas na concentração de 1000 mg L⁻¹ em acetonitrila 99,9% grau HPLC (Sigma-Aldrich). Outras soluções de trabalho usadas foram preparadas a partir da solução estoque, por meio de diluições. Todas estas soluções foram armazenadas em freezer à temperatura de aproximadamente - 20 °C (\pm 2 °C).

Também foram utilizados neste estudo os sorventes quitosana (Sigma-Aldrich), sílica (Merck), florisil (Sigma-Aldrich), PSA (Agilent Technologies), C18 (Supelco), GBC (Supelco), sulfato de sódio (Na₂SO₄) (Vetec).

3.2. Equipamentos

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás (Shimadzu) equipado com um detector espectrômetro de massa (MS) tipo quadrupolo (GCMS-QP2010), e um auto-injetor (AOC-20i.), marca Shimadzu. Um banho ultrassônico (Sanders) operado a 280W e 40 kHz, balança analítica (Shimadzu AUY 220), um agitador vórtex (Certomat® MV), uma centrífuga (Quimis®, ISO 8001), um espectrofotômetro (USB2000+, Ocean Optics) e um freezer 280 L (Consul).

3.3. Condições Cromatográficas

As seguintes condições cromatográficas, programação de aquecimento da coluna, temperatura do injetor e do detector, modo de injeção e vazão do gás de arraste, foram otimizadas com o objetivo de se obter uma boa resolução e separação dos picos dos pesticidas em um menor tempo de análise.

A separação cromatográfica de todos os analitos foi realizada utilizando uma coluna capilar (SH-Rtx-5MS) cuja fase estacionária é composta de 5% fenil e 95% dimetilpolissiloxano com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme. O gás de arraste utilizado foi o hélio (grau de pureza 99,999%, White Martins) a uma vazão de 1,17 mL min⁻¹. A programação de temperatura consistia em manter a temperatura inicial em 160 °C por 1 min, aquecer a uma taxa de 20 °C min⁻¹ até 290 °C e manter esta temperatura por 2,5 min. O tempo total de análise foi de 10,00 min. A temperatura do injetor foi mantida a 300 °C. Um volume de 1 µL de amostra foi injetado no cromatógrafo, usando o modo de injeção splitless.

O espectrômetro de massas (MS) foi operado por impacto de elétrons 70 eV. Foi definido um corte de 5 min para evitar danos ao instrumento. As temperaturas da interface do detector foi de 300 °C, e a temperatura da fonte de ionização foi de 230 °C. Primeiramente uma análise no modo *Scan* ou *TIC* (*total ion chromatogram*-cromatograma de íons totais) foi realizada para obtenção dos tempos de retenção (t_R) e dos espectros de massas dos pesticidas em estudo. A partir desses espectros foram definidos os íons dos compostos para realizar as análises no modo de monitoramento seletivo de íons (*Select Ion Monitoring-SIM*).

3.4. Amostras de chá

Para otimização e validação da técnica SLE/LTP associada à d-SPE, amostras de chá verde isentas de pesticidas foram adquiridas no mercado de Viçosa-MG. A ausência dos pesticidas foi confirmada analisando seus extratos por GC-MS.

Nas etapas de otimização as matrizes foram fortificadas com solução padrão contendo todos os analitos em estudo, preparados em acetonitrila.

3.5. Remoção de clorofila por d-SPE de extratos obtidos de folhas de chá verde por SLE/LTP

3.5.1. Processo de extração

Para a obtenção dos extratos, 1,0 g de folhas de chá verde desidratadas, trituradas e peneiradas em peneira de 40 mesh foram colocadas em contato com 3,0 mL de água ultrapura obtida no sistema Milli-Q, 4,0 mL de acetonitrila e agitadas em vórtice por 60 s e centrifugado por 9 min a 560 g. Essa mistura foi então colocada em freezer a -20 °C por 6 horas.

Após o congelamento da água e da amostra, o extrato orgânico foi coletado e utilizado no estudo de limpeza (remoção de clorofila).

3.5.2. Remoção de clorofila dos extratos de folha de chá verde obtidos da SLE/LTP (*Clean-up*)

Diferentes sorventes foram utilizados para avaliar a remoção de clorofila nos extratos obtidos da SLE/LTP por d-SPE. Foram utilizados como sorvente florissil, quitosana, sílica, PSA, C18 e GBC e também algumas misturas sendo, PSA/C18 (1:1, m/m), PSA/C18/GBC (1:1:1, m/m/m), PSA/GBC (1:1, m/m) e C18/GBC (1:1, m/m).

Esta avaliação foi realizada transferindo 1,5 mL do extrato, resultante da SLE/LTP, para um frasco de teflon com capacidade de 15,00 mL contendo 125 mg de cada sorvente. O sistema foi agitado em vórtex (3 min) e logo após centrifugado (4 min). O sobrenadante foi recolhido e diluído em acetonitrila, na proporção 1:4 v/v (extrato: solvente) e posteriormente analisados em um espectrofotômetro. As análises foram realizadas no comprimento de onda de máxima absorbância da clorofila que é de 660 nm.

3.5.3. Seleção de sorvente para d-SPE

Para avaliar o melhor sorvente ou mistura de sorventes para a remoção da clorofila nos extratos obtidos por SLE/LTP, foi realizada uma otimização univariada. Todos os parâmetros da SLE/LTP e da d-SPE foram mantidos constantes nesta etapa. Sendo para a SLE/LTP volume de água (3,0 mL), volume de acetonitrila (4,0 mL), agitação em vórtex (60 s), centrifugação (9 min, 560 g) e congelamento a -20 °C (6 h). Para a d-SPE foram mantidos

constantes a massa do sorvente (125 mg), tempo de agitação (3 min) e centrifugação (4 min). Foram avaliados quitosana, sílica, florisil, PSA, C18 e GBC e também misturas dos mesmos, PSA/C18 (1:1, m/m), PSA/C18/GBC (1:1:1, m/m/m), PSA/GBC (1:1, m/m) e C18/GBC (1:1, m/m). As absorbâncias dos extratos após a etapa de limpeza foram utilizadas como respostas analíticas.

3.5.4. Otimização das proporções entre os sorventes

Após a otimização dos sorventes mais adequados (PSA/C18) para remoção da clorofila no extrato obtido por SLE/LTP, foi avaliada a melhor proporção entre esses sorventes. Para este estudo uma otimização univariada foi realizada, variando as proporções de PSA/C18 (1:1, m/m), PSA/C18 (1:3, m/m) e PSA/C18 (3:1, m/m). Os demais parâmetros da SLE/LTP e d-SPE foram mantidos constantes como descrito no item 3.5.3.

3.5.5. Estudo da retenção dos analitos pelos sorventes

Um estudo para avaliar a possível retenção dos analitos pela mistura dos sorventes PSA/C18 (1:1, m/m) foi realizado empregando um extrato da SLE/LTP fortificado com os pesticidas, na concentração de 0,80 mg L⁻¹. Estas amostras foram analisadas, em triplicata, por GC-MS. Posteriormente, essas amostras foram submetidas à limpeza por d-SPE e analisadas por GC-MS. Os resultados obtidos para o extrato sem a etapa de *clean-up* foram utilizados como referência neste estudo.

3.5.6. Otimização da técnica dispersão em fase sólida (d-SPE)

Após definir os sorventes e suas proporções, um planejamento 2³ com ponto central (n=3) foi realizado com o objetivo de otimizar a massa destes, o tempo de agitação e o tempo de centrifugação para obter um *clean-up* adequado por d-SPE. As absorbâncias dos extratos após tratamento foram utilizadas como respostas analíticas. Os dados do planejamento são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Planejamento fatorial 2^3 com ponto central (n=3) para otimização dos parâmetros massa de sorvente, tempo de agitação e tempo de centrifugação para d-SPE usada no *clean-up* de extrato de folhas de chá verde obtidas por SLE/LTP.

Variáveis	Níveis		
	(-1)	(0)	(+1)
Massa sorvente (mg)	75	100	125
Tempo de agitação (min)	1	2	3
Tempo de centrifugação (min)	2	3	4

Ensaio	Fatores codificados		
	Massa sorvente	Tempo de agitação	Tempo de centrifugação
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

3.6. Fortificação das amostras de folha de chá verde

Neste estudo, amostras de folhas de chá verde (1,0 g) foram trituradas, peneiradas e pesadas em balança analítica. Essas amostras foram fortificadas com 0,1 mL da solução de trabalho contendo os pesticidas (pirimifos-metílico, clorpirifós, triadimenol, flutriafol, dieldrin, ciproconazol, bifentrina, λ -cialotrina) na concentração de 32,0 mg L⁻¹.

As amostras de chá verde fortificadas foram agitadas em vórtex durante 10 segundos e deixadas em repouso por duas horas, de maneira a conseguir uma melhor interação dos pesticidas com a amostra e para evaporação do solvente orgânico proveniente da solução padrão. Após as duas horas todas as amostras foram submetidas ao processo de extração, de maneira a determinar as condições ótimas para análise dos oito pesticidas em estudo por cromatografia gasosa.

3.7. Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP)

3.7.1. Extração dos pesticidas por SLE/LTP – Técnica geral

Uma massa de 1,0 g das amostras de folha de chá verde foi pesada em frascos de vidro com tampa plástica, com capacidade de 22,00 mL. Essas amostras foram fortificadas de acordo com o item 3.6. Essas amostras foram agitadas em vórtex por 10 s e deixadas em repouso por duas horas. Posteriormente, a essas amostras foram adicionadas água, acetonitrila e sal de acordo com o planejamento proposto (Tabela 3). A mistura obtida foi em seguida agitada em vórtex. Após agitação as amostras foram levadas à centrifugação a 560 g e colocadas em freezer a -20 °C. O volume de água, volume de acetonitrila, força iônica, tempo de agitação, tempo de centrífuga e tempo de freezer foram otimizados para se obter melhor eficiência na extração dos pesticidas em estudo.

Após congelamento da água e da amostra a fase orgânica foi recolhida e empregada no estudo de *clean-up*

3.7.2. Otimização da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP)

Após a otimização da etapa de *clean-up* (d-SPE) a técnica SLE/LTP foi otimizada e alguns parâmetros importantes para análise dos pesticidas em estudo foram avaliados procurando-se obter os melhores rendimentos com menor tempo de análise e baixo custo. A otimização da SLE/LTP foi dividida em duas etapas, na primeira foram otimizados o volume de água, o volume de solvente extrator e a força iônica, e na segunda foram otimizados os tempos de agitação, centrifugação e congelamento.

3.7.3. Otimização dos parâmetros volume de água, volume do solvente extrator e a força iônica na SLE/LTP

Um planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central (n=3) foi utilizado para otimizar estes parâmetros. As áreas relativas obtidas nas análises foram utilizadas como respostas analíticas. Os dados do planejamento são apresentados na Tabela 3. Para avaliar a força iônica foi utilizado sulfato de sódio (Na₂SO₄).

Tabela 3. Planejamento fatorial 2^3 com ponto central (n=3) aplicado na otimização do volume de acetonitrila, volume de água e força iônica para SLE/LTP usada na extração de pesticidas presentes em amostras de folhas de chá verde.

Variáveis	Níveis		
	(-1)	(0)	(+1)
Força iônica (mol L ⁻¹)	0	0,01	0,02
Volume de água (mL)	3	4	5
Volume de acetonitrila (mL)	4	5	6

Ensaio	Fatores codificados		
	Força iônica	Volume de água	Volume de acetonitrile
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

3.7.4. Otimização dos parâmetros tempo de agitação, centrifugação e congelamento para SLE/LTP

Um segundo planejamento foi realizado para otimizar o tempo de agitação, centrifugação e de congelamento, com a finalidade de se obter uma melhor extração para os pesticidas estudados. Para isso, também foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central (n=3). Utilizou-se como resposta analítica as áreas relativas obtidas nas análises. Os dados do planejamento estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4. Planejamento fatorial 2^3 com ponto central (n=3) aplicado na otimização do tempo de agitação, centrifugação e congelamento para SLE/LTP usada na extração de pesticidas presentes em amostras de folhas de chá verde.

	Variáveis	Níveis		
		(-1)	(0)	(+1)
Tempo	Agitação (s)	30	45	60
	Centrifugação (min)	3	6	9
	Congelamento (h)	4	5	6
Ensaio	Fatores codificados			
	Agitação	Centrifugação	Congelamento	
1	-	-	-	
2	+	-	-	
3	-	+	-	
4	+	+	-	
5	-	-	+	
6	+	-	+	
7	-	+	+	
8	+	+	+	
9	0	0	0	
10	0	0	0	
11	0	0	0	

3.8. Validação do método SLE/LTP

O método SLE/LTP-GC-MS otimizado para determinação de pesticidas em folhas de chá verde foi validado e seguiu os critérios estabelecidos pelo órgão regulador ANVISA, Resolução RDC nº 166/17 (ANVISA, 2017). As figuras de mérito avaliadas foram seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão (ensaios de recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e efeito de matriz.

Apenas os pesticidas pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina foram validados para a folha de chá verde devido a problemas com o sistema cromatográfico, ocorrendo a perda de sensibilidade para alguns pesticidas mesmo após manutenção do mesmo.

3.8.1. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas dos extratos das amostras de folhas de chá verde isenta dos pesticidas em estudo (branco analítico) com os cromatogramas dos extratos de folhas de chá verde fortificadas com os pesticidas pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina.

3.8.2. Limite de quantificação e limite de detecção

O limite de detecção (LD) deve ser constatado pela obtenção da menor quantidade do analito em uma amostra que poderá ser detectado, porém não quantificado. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2017).

O limite de detecção (LD) do método proposto foi estabelecido considerando o valor igual a três vezes o sinal da linha base (ruído) obtido pela injeção do extrato da amostra de chá verde isenta dos pesticidas no GC-MS. O limite de quantificação (LQ) foi determinado considerando um sinal dez vezes maior que o sinal ruído (ANVISA, 2017).

3.8.3. Linearidade do método

A linearidade do método SLE/LTP-GC-MS foi avaliada através de curvas analíticas construídas pela relação da área do analito com suas respectivas concentrações. As amostras de folhas de chá verde foram fortificadas e submetidas ao método SLE/LTP. Uma curva analítica foi construída com seis níveis de concentração (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0 mg kg⁻¹) para pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina. A linearidade foi determinada com base no coeficiente de determinação (R²) e pelo gráfico de resíduos.

3.8.4. Exatidão

A exatidão do método foi obtida por ensaios de recuperação (% R), realizados em três concentrações diferentes (0,05; 0,4 e 1,0 mg kg⁻¹) e em triplicata (ANVISA 2017). A porcentagem de recuperação foi obtida conforme a Equação 1. Para o estudo de exatidão as folhas de chá verde foram fortificadas e submetidas ao método SLE/LTP-GC-MS.

$$\%R = \left[\frac{C_E \times 100}{C_R} \right] + 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde,

C_E = Média das concentrações obtidas experimentalmente;

C_R = Concentração real (concentração em que as amostras foram fortificadas).

3.8.5. Precisão

A precisão do método representa a dispersão de seus resultados em diferentes ensaios. A precisão do método otimizado SLE/LTP-GC-MS para determinação de resíduos de pesticidas em folhas de chá verde foi avaliada por estudos de repetitividade e precisão intermediária em três níveis de concentração (0,05; 0,4 e 1,0 mg kg⁻¹) com três repetições em cada nível. Amostras de folhas de chá verde foram fortificadas e submetidas ao método. Esses resultados são avaliados pelo coeficiente de variação (CV), calculados conforme a Equação 2.

$$CV = \left(\frac{s}{x} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde,

s = Desvio padrão das áreas obtidas;

x = Média entre as áreas obtidas.

3.8.6. Repetitividade

Para avaliar a repetitividade foi realizado um experimento onde as folhas de chá verde foram fortificadas e submetidas ao método SLE/LTP-GC-MS para três níveis de concentração (0,05; 0,4; 1 mg kg⁻¹) em triplicata para todos os pesticidas em estudo. Para tal estimativa, foram determinados os coeficientes de variação (CV) de cada pesticidas.

3.8.7. Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada pelos seus respectivos coeficientes de variação (CV) de cada pesticidas em estudo, que foram obtidos pelas análises dos extratos em três níveis de concentração (0,05; 0,4; 1 mg kg⁻¹) e em triplicata. A precisão intermediária foi realizada utilizando os mesmos equipamentos pelo mesmo analista em três dias diferentes (dia 1, dia 3 e dia 5).

3.8.8. Efeito de matriz

A avaliação do efeito de matriz foi realizada comparando as curvas analíticas das soluções padrões preparados em acetonitrila e a curvas preparadas nos extratos orgânicos das folhas de chá verde isentas dos pesticidas em estudo, obtidos após a realização da extração SLE/LTP (PINHO *et al.*, 2009). O efeito de matriz percentual foi determinado de acordo com a Equação 3 (KWON *et al.*, 2012).

$$\%EM = \left[\frac{a_E - a_S}{a_S} \right] \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde,

a_E = Inclinação da curva analítica de cada pesticida preparada em extrato da matriz;

a_S = Inclinação da curva analítica de cada pesticida preparada em solvente puro.

3.9. Aplicação do método

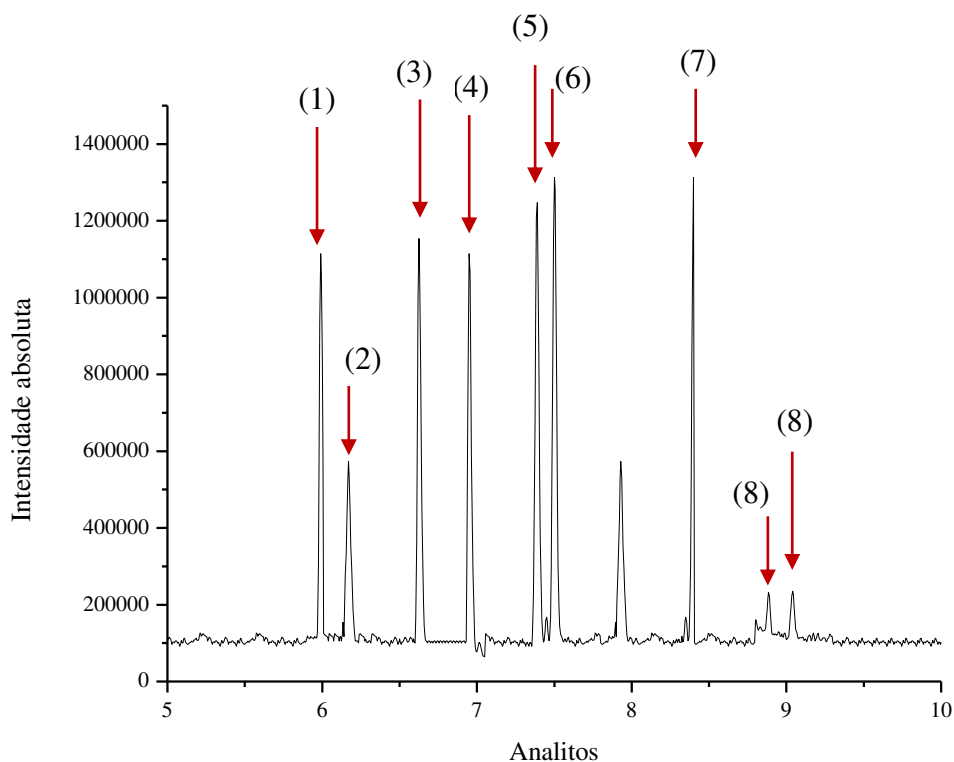
O método SLE/LTP-GC-MS validado, foi aplicado para determinação dos pesticidas (pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina) em diferentes amostras de chás das regiões Sudeste e Sul do Brasil. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas. A aplicação do método SLE/LTP-GC-MS foi realizada em 14 variedades de chá, totalizando 51 amostras. A distribuição das amostras incluiu oito de chá verde (*Camellia sinensis*), três de chá preto (*Camellia sinensis*), três de chá branco (*Camellia sinensis*), sete de erva-cidreira (*Melissa officinalis*), cinco de erva-doce (*Pimpinella anisum*), sete de camomila (*Matricaria recutita*), seis de cavalinha (*Equisetum giganteum*), duas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), quatro de boldo (*Peumus boldus*), duas de hortelã (*Mentha sp*) e uma amostra de dente-de-leão (*Taraxacum officinale*), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*), quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise cromatográfica

Todos os pesticidas foram analisados em um GC-MS no modo *Scan* e *SIM*, respectivamente. Todos os cromatogramas foram obtidos como descrito no item 3.3. O tempo necessário para total eluição de todos os analitos foi de 10,0 min. Os tempos de retenção dos analitos, foram obtidos pela análise, no modo *Scan*, de uma solução padrão contendo os pesticidas pirimifós-metílico, clorpirifós, triadimenol, flutriafol, dieldrin, ciproconazol, bifentrina e λ -cialotrina na concentração de 3,0 mg L⁻¹ preparada em acetonitrila (Figura 1). Com auxílio da biblioteca (NIST 2014) foi possível identificar cada pesticidas em estudo.

Figura 1. Cromatograma, no modo *Scan*, de uma solução padrão em acetonitrila dos pesticidas (1) pirimifós-metílico ($t_R = 5,96$ min), (2) clorpirifós ($t_R = 6,18$ min), (3) triadimenol ($t_R = 6,67$ min), (4) flutriafol ($t_R = 6,98$ min), (5) dieldrin ($t_R = 7,29$ min), (6) ciproconazol ($t_R = 7,39$ min), (7) bifentrina ($t_R = 8,38$ min) e (8) λ -cialotrina ($t_R = 8,89; 9,09$ min) na concentração de $3,0 \text{ mg L}^{-1}$.



É possível observar no cromatograma a presença de picos simétricos e que as condições cromatográficas estabelecidas forneceram uma boa resolução, pois não houve sobreposição de picos. No cromatograma obtido, a presença de picos duplos para a λ -cialotrina (pico 8) é devida à formação de um isômero durante a injeção no cromatógrafo a gás (MASTOVSKA, 2004). Para o tratamento dos dados foi utilizada a soma das áreas dos picos isômeros. As razões massa/carga (m/z) selecionadas para cada composto em seu respectivo tempo de retenção são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Íons selecionados dos pesticidas em estudo e o tempo de retenção.

Pesticidas	Íons monitorados (m/z)	Tempo de retenção (min)
Pirimifos-metílico	290, 276, 305	5,96
Clorpirifós	199, 197, 314	6,18
Triadimenol	112, 168, 128	6,67
Flutriafol	123, 164, 219	6,98
Dieldrin	79, 81, 82	7,29
Ciproconazol	222, 139, 125	7,39
Bifentrina	181, 166, 165	8,38
λ -cialotrina	181, 197, 208	8,89; 9,09

4.2. Remoção clorofila das folhas de chá verde (*Clean-up*)

A otimização para este estudo foi dividida em três etapas. Na primeira, os sorventes foram avaliados, na segunda foram otimizadas as proporções entre os sorventes que promoveriam maior remoção de clorofila e na terceira otimização foram avaliadas a massa dos sorventes, o tempo de agitação e o tempo centrifugação utilizados na d-SPE.

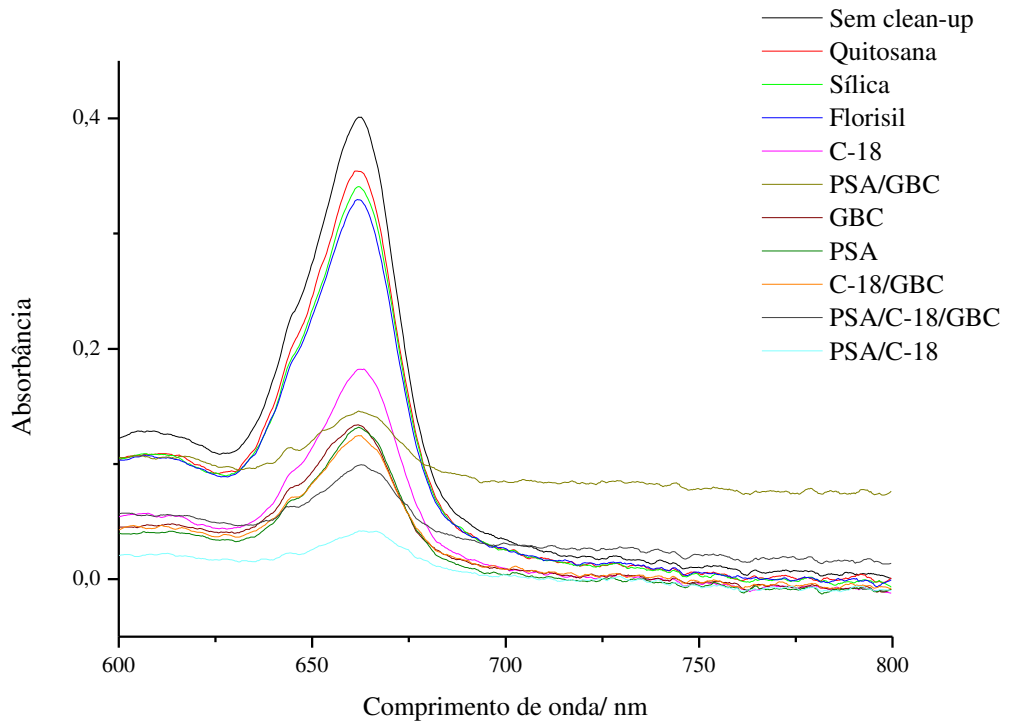
Para este estudo foi utilizado um espectrofotômetro e as absorbâncias obtidas para os extratos em 660 nm, comprimento de onda de máxima absorção da clorofila, foram usadas como resposta analítica.

4.2.1. Otimização dos sorventes

Vários sorventes e misturas de sorventes foram testados, em triplicata, para remoção de clorofila dos extratos das amostras obtidas pela técnica SLE/LTP. Foi comparada a absorbância do extrato obtido das folhas de chá verde sem o *clean-up*, onde foi considerado o valor de 100% de clorofila, com a absorbância de cada *clean-up*, para avaliar sua remoção.

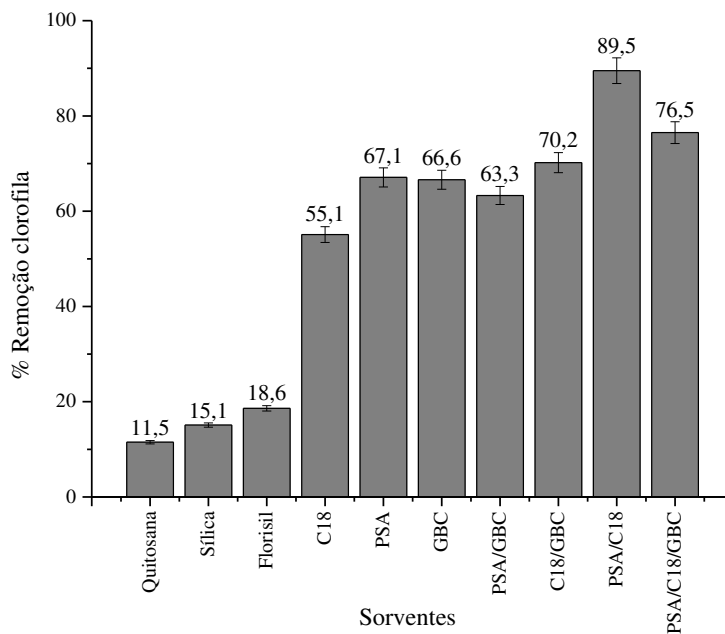
Os espectros de absorção na região do visível (600 a 800 nm), apresentados na Figura 2 mostram um pico com máxima absorção no comprimento de onda de 660 nm, referente à absorção da clorofila. As absorbâncias neste comprimento de onda foram empregadas para avaliar os extratos obtidos pela técnica SLE/LTP e submetidos ao *clean-up* por d-SPE com diferentes sorventes e misturas de sorventes.

Figura 2. Espectro de absorção para a clorofila no extrato obtido por SLE/LTP sem *clean-up* e submetido a etapa de *clean-up* por d-SPE com diferentes sorventes.



A porcentagem da remoção de clorofila do extrato de folha de chá verde obtido por SLE/LTP por d-SPE para cada um dos sorventes é mostrada na Figura 3.

Figura 3. Porcentagem de remoção de clorofila por d-SPE do extrato de folha de chá verde obtido por SLE/LTP para diferentes sorventes.

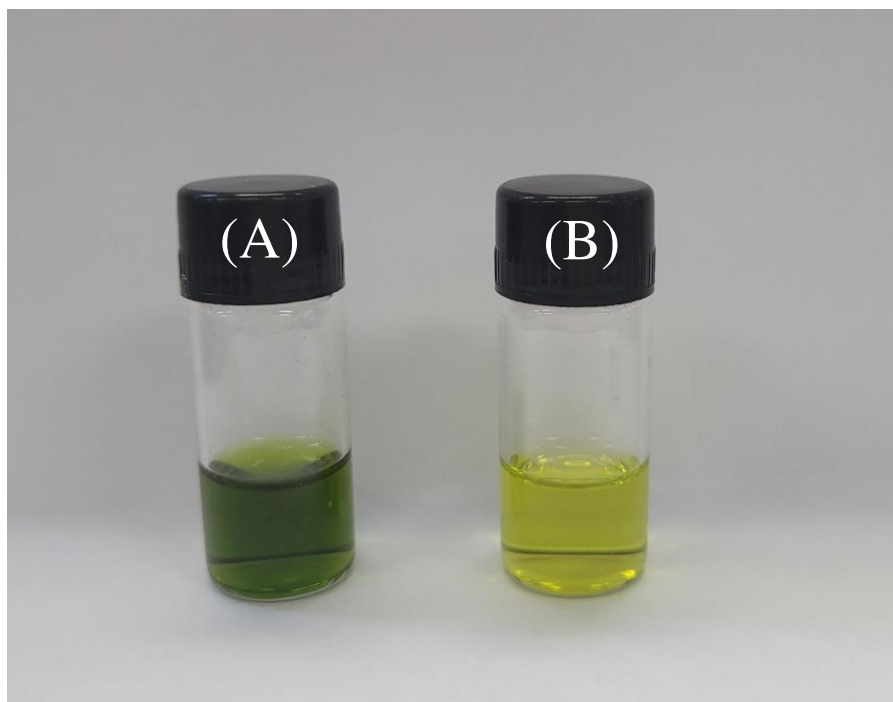


Como mostrado na Figura 3, dentre todos os sorventes testados, observou-se que a mistura de PSA/C18 apresentou melhor resultado em relação aos outros sorventes para remoção de clorofila das amostras de folha de chá verde, obtendo uma remoção de 89,5%. Esses sorventes vêm sendo muito utilizados em trabalhos com matrizes como chá para a etapa de *clean-up* como é o caso do trabalho de STEINIGER *et al.*, 2010.

Quando testados individualmente, os sorventes PSA e C18 apresentaram menor eficiência em comparação à sua combinação. Isto sugere que sua mistura permite uma ação complementar, resultando em uma remoção mais eficaz da clorofila do meio. C18 é reconhecido pela sua eficácia na extração de substâncias apolares e moderadamente polares. Por outro lado, o PSA funciona como um trocador de ânions e pode interagir com outros compostos através de ligações de hidrogênio ou interações dipolo-dipolo. Além disso, devido à presença de grupos amino primários e secundários em sua estrutura, o PSA também pode servir como agente quelante, tornando-o mais adequado para extração de compostos polares. A clorofila, por outro lado, contém grupos polares e apolares em sua estrutura, permitindo-lhe interagir com ambos os sorventes (LIU *et al.*, 2011). Isso fornece uma justificativa para a maior eficiência de extração observada quando PSA e C18 foram combinados para remoção de clorofila via d-SPE.

A diferença de coloração entre os extratos da amostra de chá verde obtidos pela técnica SLE/LTP sem *clean-up* e com *clean-up* (PSA/C18), pode ser observada na Figura 4.

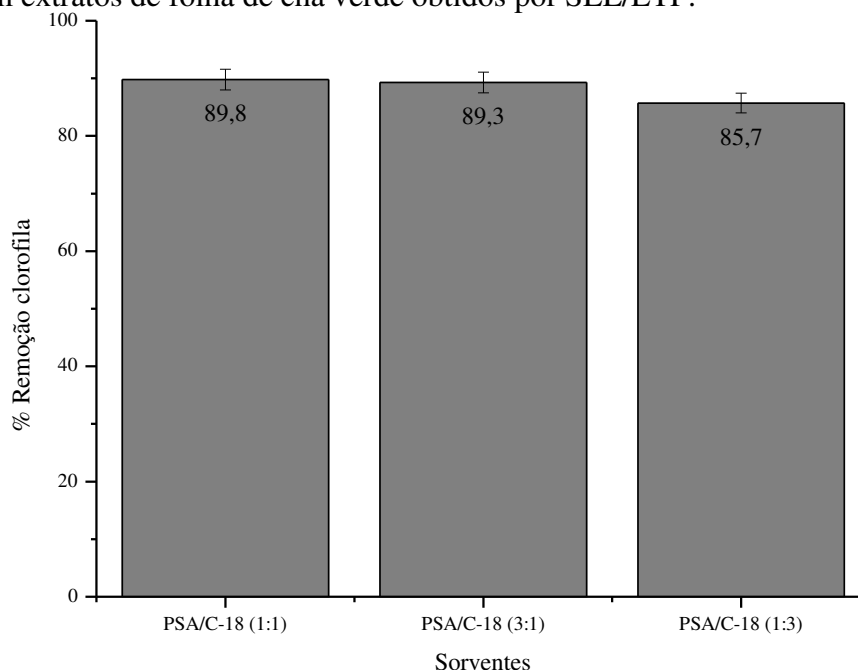
Figura 4. Extratos de chá verde obtidos pela técnica SLE/LTP (A) sem limpeza e (B) com *clean-up* com mistura PSA/C18.



4.2.2. Otimização da proporção entre os sorventes

Após definir o melhor sorvente para remoção de clorofila dos extratos de SLE/LTP por d-SPE como sendo a mistura de PSA/C18, uma nova otimização univariada foi feita para avaliar a melhor proporção dos sorventes, conforme descrito no item 3.5.4. A absorbância foi avaliada no comprimento de onda de máxima absorção e avaliada a melhor remoção. A análise foi realizada em triplicata e os resultados são apresentados na Figura 5.

Figura 5. Diferentes proporções de PSA/C18 utilizados na etapa de *clean-up* para remoção de clorofila em extratos de folha de chá verde obtidos por SLE/LTP.



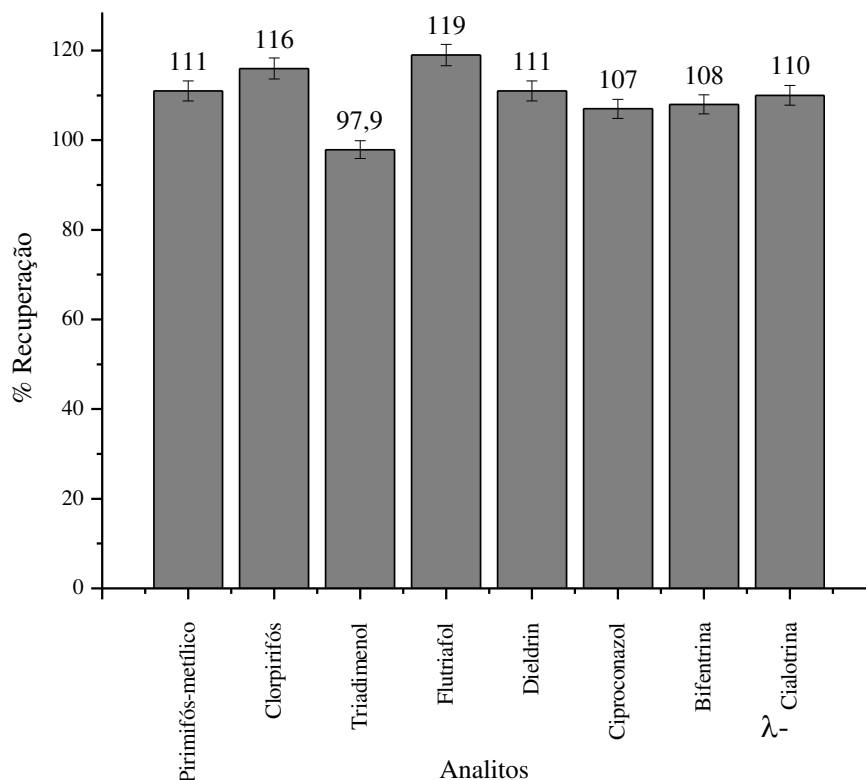
Os resultados para as três proporções avaliadas mostraram uma diferença mínima na remoção de clorofila. O aumento da quantidade de PSA conferiu maior polaridade à mistura de adsorventes, mas não impactou significativamente a porcentagem de remoção de clorofila. Por outro lado, o aumento da proporção de C18 reduziu a polaridade da mistura de adsorventes e diminuiu a eficiência da remoção, indicando uma menor interação entre a molécula de clorofila e os adsorventes no meio. Conseqüentemente, a proporção PSA/C18 1:1 (m/m) foi escolhida para as etapas seguintes deste estudo.

4.2.3. Estudo da retenção dos analitos em estudo

Um estudo de recuperação para avaliar se os sorventes PSA/C18 (1:1) poderiam reter os analitos em estudo foi realizado. O extrato fortificado foi submetido à etapa de *clean-up* e analisado por GC-MS. As áreas dos pesticidas no extrato sem *clean-up* foram comparadas

com as áreas dos mesmos no extrato submetido ao *clean-up*. Os resultados dos percentuais de recuperação são mostrados na Figura 6.

Figura 6. Porcentagem de recuperação de cada analito em extrato de chá verde obtidos por SLE/LTP submetidos a d-SPE contendo uma mistura de PSA/C18.



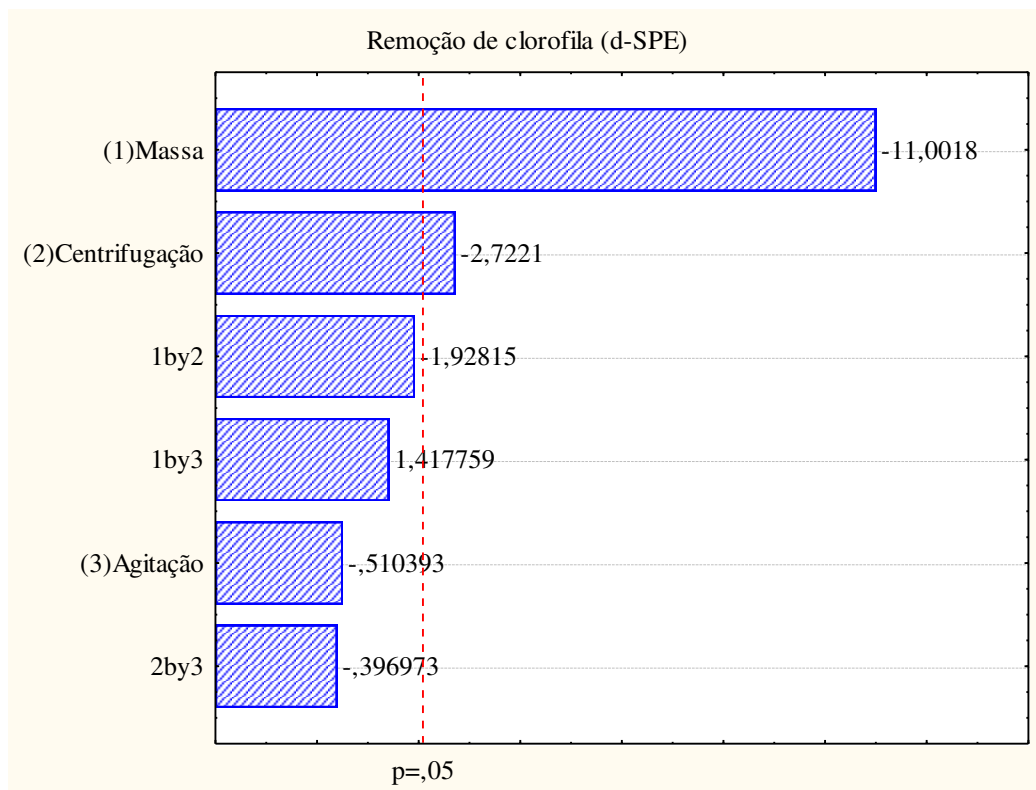
A taxa de recuperação dos analitos no extrato submetido à SLE/LTP apresentou uma variação entre 107-119%. A observação de valores acima de 100% sugere a possibilidade de interferência na matriz. É importante notar que, mesmo com essa variação, os resultados indicam uma recuperação satisfatória, pois valores entre 70-120% são considerados aceitáveis (ANVISA, 2017).

4.2.4. Otimização da técnica dispersão em fase sólida (d-SPE)

No processo de otimização da técnica d-SPE para a etapa de *clean-up* alguns parâmetros importantes para a análise da remoção da clorofila foram avaliados. Foram otimizados a massa do sorvente, tempo de agitação e tempo de centrifugação conforme descrito no item 3.5.6.

A otimização destes fatores foi realizada através de um planejamento 2^3 com ponto central e a significância de cada fator foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) usando níveis de significância p-valor. A absorbância de cada ensaio foi empregada para avaliar os resultados e gerar o gráfico de Pareto dos efeitos e interações, apresentado na Figura 7.

Figura 7. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis massa do sorvente (1), tempo de centrifugação (2) e tempo de agitação (3) para remoção de clorofila em extrato de chá verde obtido por SLE/LTP por d-SPE.



Como pode ser observado, pelo gráfico de Pareto, a massa do sorvente (fator 1) foi significativa de modo negativo, indicando que maior massa gera menor sinal de absorbância. O tempo de centrifugação também foi significativo de modo negativo (fator 2), indicando que maior tempo de centrifugação diminui a resposta da absorbância. Já para a agitação (fator 3), a resposta não foi significativa. Como menor absorbância indica a melhor remoção da clorofila no extrato de SLE/LTP, será utilizado para a etapa de *clean-up* do extrato de SLE/LTP de folha de chá verde a maior massa de sorvente, sendo esta 125 mg, o maior tempo de centrifugação, que é de 4 min e o menor tempo de agitação, 1 min.

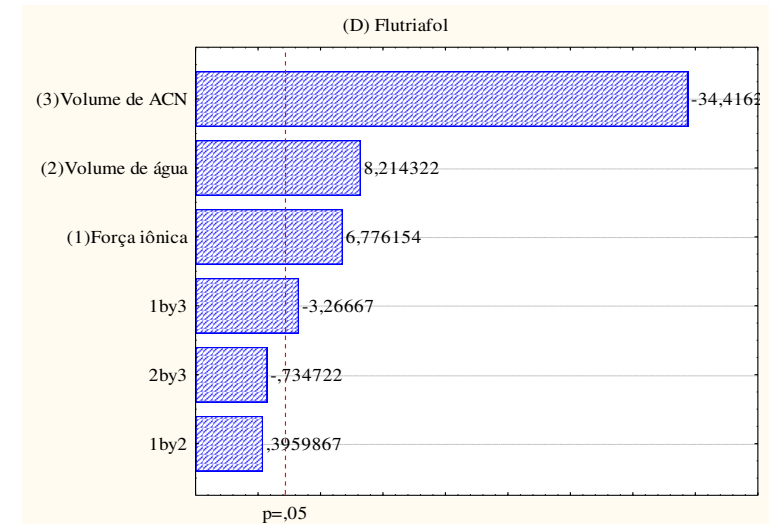
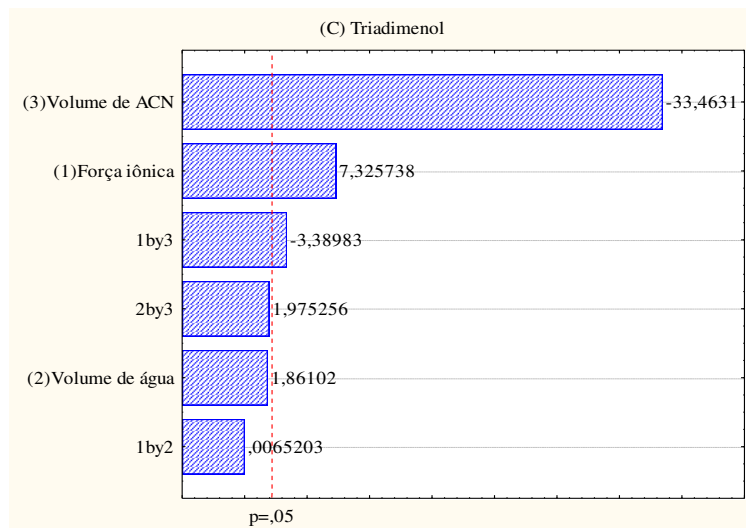
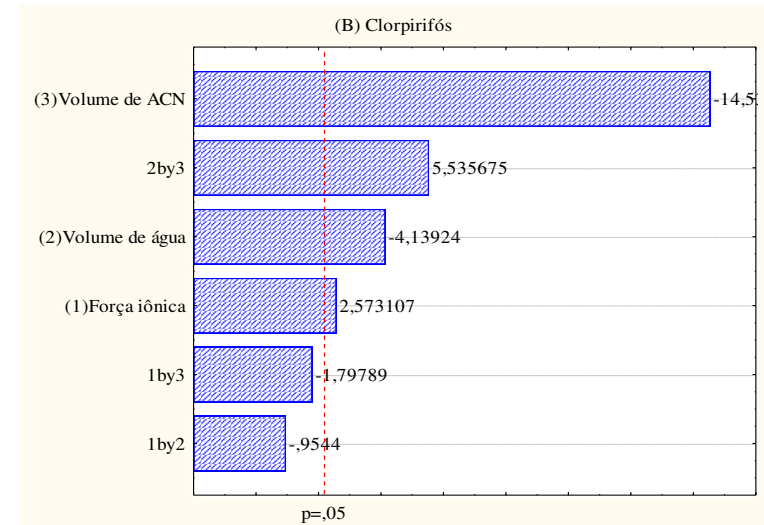
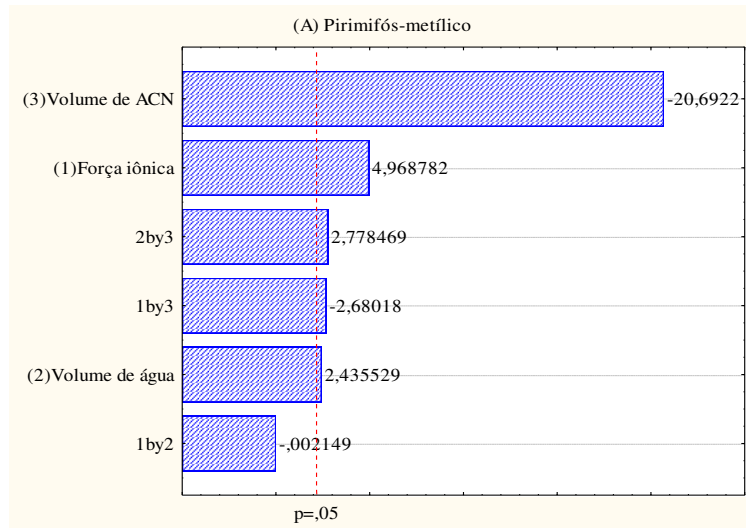
4.3. Otimização da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) para determinação de resíduos de pesticidas das folhas de chá verde

A otimização para este estudo foi dividida em duas etapas. Na primeira, os volumes de água, de solvente extrator e força iônica foram otimizados e na segunda foram otimizados os tempos de agitação, de centrifugação e de congelamento.

4.3.1. Otimização do volume de água, volume de acetonitrila e força iônica na SLE/LTP

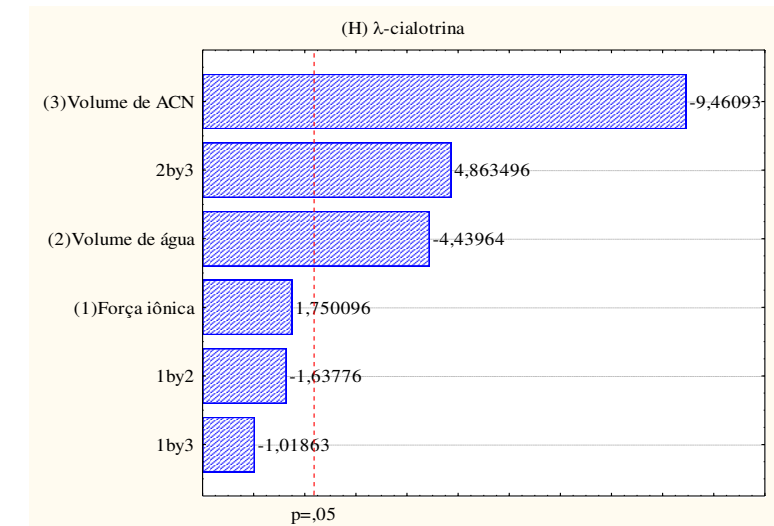
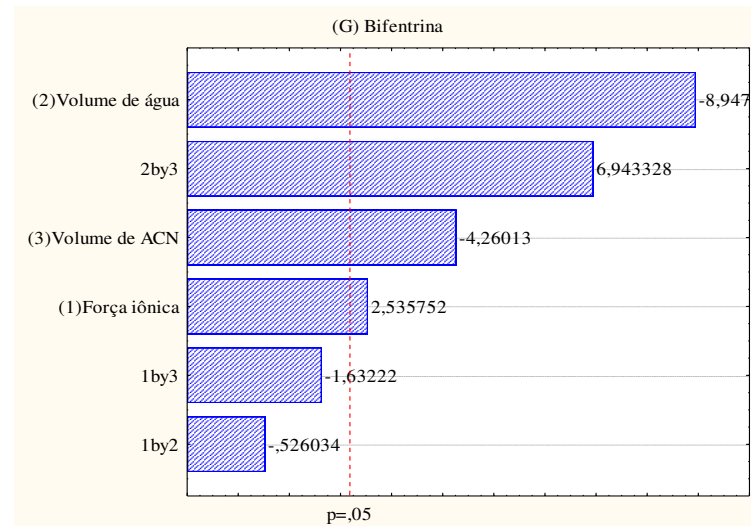
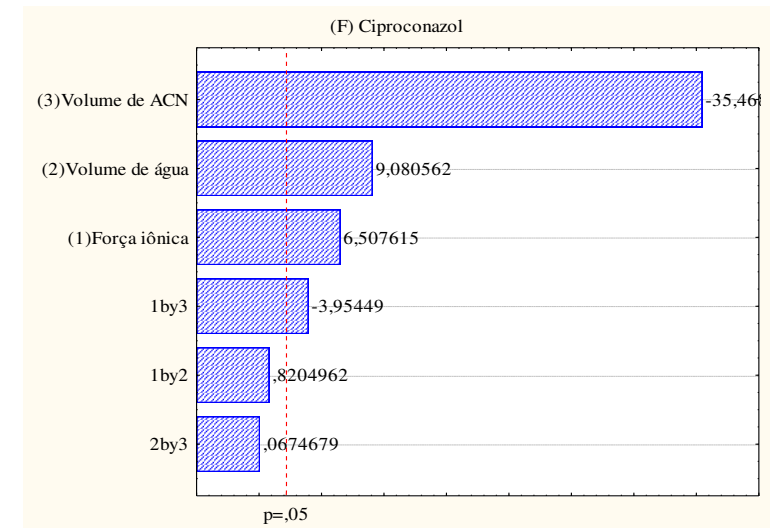
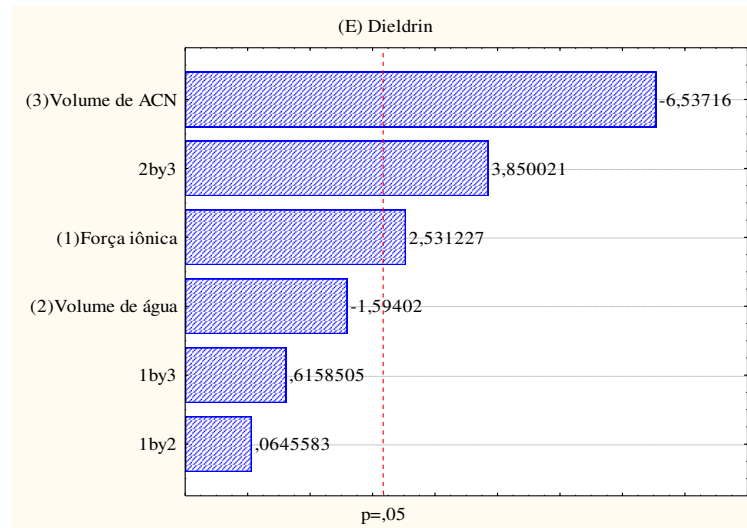
Os volumes de água, acetonitrila e força iônica foram otimizados utilizando um planejamento fatorial 2^3 com ponto central conforme descrito no item 3.7.3. A significância de cada fator foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) usando níveis de significância p-valor a um nível de 95% de confiança. A área de cada pesticidas nos extratos dos respectivos ensaios foi utilizada para gerar os gráficos de Pareto. Estes gráficos mostram os valores dos efeitos de cada uma das variáveis e da interação entre elas, de forma a verificar se os mesmos são estatisticamente significativos. Os gráficos foram gerados com os resultados obtidos para os pesticidas, isoladamente, como mostrado nas Figuras 8 e 9.

Figura 8. Gráficos de Pareto dos efeitos das variáveis força iônica (1), volume de água (2) e volume de ACN (3) para os pesticidas (A) pirimifós-metílico, (B) clorpirifós, (C) triadimenol, (D) flutriafol.



Fonte: A autora.

Figura 9. Gráficos de Pareto dos efeitos das variáveis força iônica (1), volume de água (2) e volume de ACN (3) para os pesticidas (E) dieldrin, (F) ciproconazol, (G) bifentrina, (H) λ -cialotrina.



A Tabela 6 apresenta um resumo com todos os analitos em estudo e os valores dos efeitos de cada uma das variáveis (força iônica, volume de água e volume de acetonitrila) e da interação entre elas na otimização da SLE/LTP em folhas de chá verde.

Tabela 6. Pesticidas em estudo e seus respectivos valores dos efeitos de cada uma das variáveis e da interação entre elas na otimização da força iônica, volume de água e volume de acetonitrila da SLE/LTP em folhas de chá verde.

Analitos	(1) Força iônica	(2) Água	(3) ACN	1x2	1x3	2x3
Pirimifos-metílico	4,97	2,43	-20,7	NS	-2,68	2,78
Clorpirifós	2,57	-4,14	-14,52	NS	NS	5,53
Triadimenol	7,32	NS	-33,5	NS	-3,39	NS
Flutriafol	6,78	8,21	-34,4	NS	-3,27	NS
Dieldrin	2,53	NS	-6,54	NS	NS	3,85
Ciproconazol	6,51	9,08	-35,5	NS	-3,95	NS
Bifentrina	2,53	-8,95	-4,26	NS	NS	6,94
λ -Cialotrina	NS	-4,44	-9,46	NS	NS	4,86

ACN = acetonitrila; NS = não significativo.

Observou-se uma influência negativa e significativa (a 95% de confiança) para todos os analitos em relação a acetonitrila. Isto significa que o uso de menores volumes de acetonitrila determinam uma maior concentração dos analitos na fase orgânica. É interessante ressaltar que esse efeito causou maior variação no resultado para todos os analitos.

O efeito da força iônica foi positivo para a extração de sete dos oito analitos em estudo, não havendo influência significativa para a λ -cialotrina.

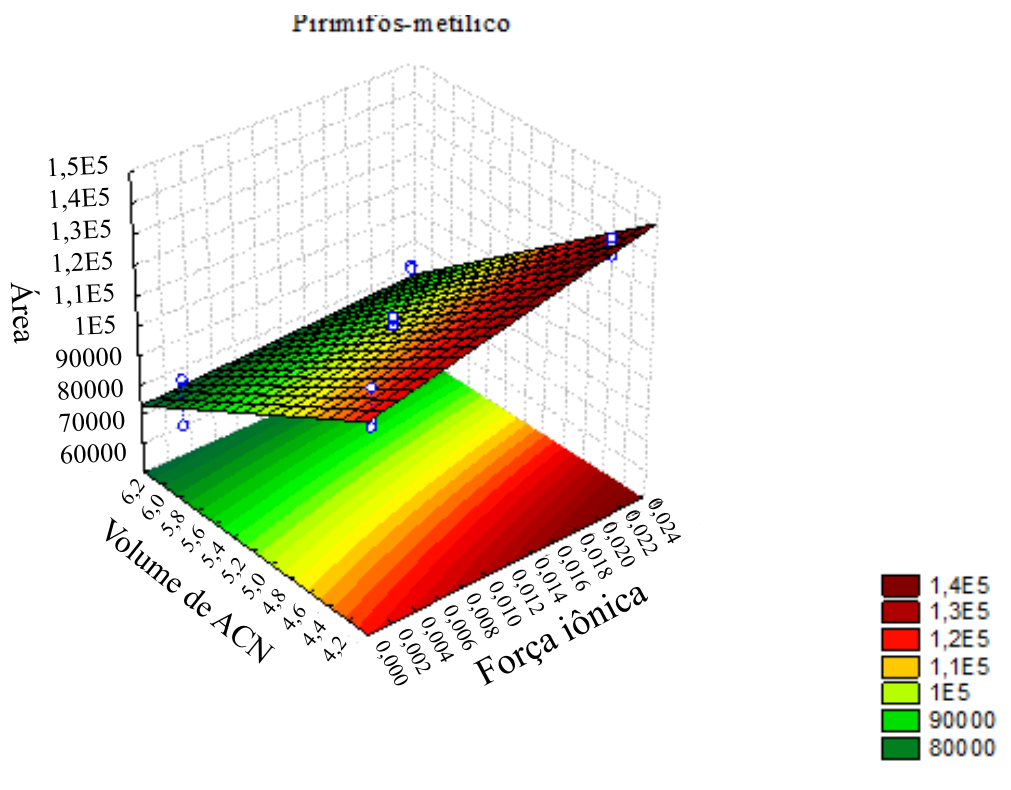
O efeito do volume de água apresentou uma complexidade maior. Para três analitos, foram observados efeitos negativos, enquanto para outros três, os efeitos foram positivos. Outros dois analitos não foram significativamente influenciados pelo volume de água.

Na técnica SLE/LTP, a amostra sólida é colocada em contato com água e um solvente miscível com água (fase única). A proporção desses solventes afeta a transferência dos analitos da amostra sólida (folhas de chá) para a fase única antes da etapa de congelamento. Uma maior porcentagem de água facilita a transferência de compostos mais polares, o que pode explicar os resultados observados no estudo.

Devido a esses diferentes efeitos observados posteriormente, investigações adicionais foram realizadas para entender o impacto da escolha de um volume de água pequeno ou grande no sinal médio do desenho experimental (termo constante). Verificou-se que o uso de grande volume de água diminuiu o sinal do bifentrina em 51% sobre o sinal médio do desenho experimental (termo constante). Por outro lado, um volume menor de água diminuiu o sinal de outros pesticidas em até 29%. Portanto, empregar menor volume de água mostrou-se mais vantajoso, pois levou a menor perda da resposta cromatográfica da bifentrina.

Por meio do gráfico de superfície (Figura 10) foi possível verificar que para o pirimifós-metílico, triadimenol, flutriafol e ciproconazol, a maior força iônica e o menor volume de acetonitrila gerou uma maior resposta, o que está de acordo com os resultados observados pelo gráfico de Pareto (Figura 8 e Figura 9). Na Figura 10 é apresentada apenas a superfície de resposta do pirimifós-metílico, pois os demais compostos (triadimenol, flutriafol e ciproconazol) seguem a mesma tendência.

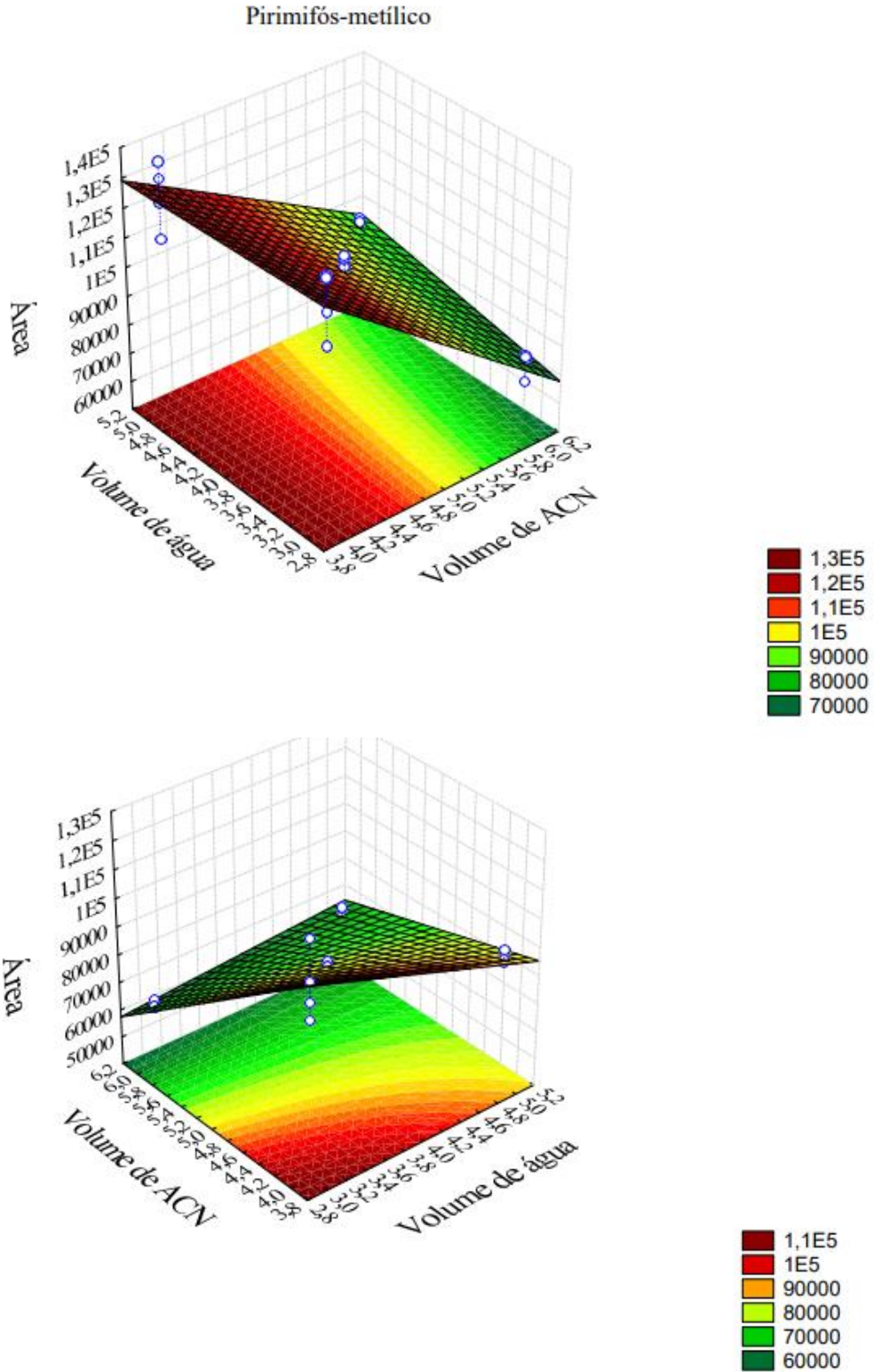
Figura 10. Superfície de resposta representando a interação entre o volume de acetonitrila e a força iônica para um planejamento 2^3 com ponto central (n=3), para o pirimifós-metílico.



Já a interação entre volume de água (Fator 2) e o volume de acetonitrila (Fator 3) foi significativa positiva para pirimifós-metílico, clorpirifós, dieldrin, bifentrina e λ -cialotrina,

como mostrado na Figura 8 e Figura 9. Através dessa informação, para se determinar a influência de cada um dos parâmetros na interação, a superfície de resposta foi analisada. Apenas as superfícies de respostas do pirimifós-metílico e do clorpirifós (Figura 11) serão apresentadas, pois os compostos dieldrin, bifentrina e λ -cialotrina seguem a mesma tendência da superfície de resposta do clorpirifós.

Figura 11. Superfícies de respostas representando a interação entre o volume de acetonitrila e o volume de água para um planejamento 2^3 com ponto central (n=3), para o pirimifós-metílico e o clorpirifós.



Esses resultados mostram que o menor volume de água irá favorecer a extração dos pesticidas em estudo. Enquanto a maior força iônica irá favorecer a extração de sete dos oito analitos em estudo, com exceção da λ -cialotrina cuja resposta não foi significativa. Com relação ao volume de acetonitrila, o menor valor irá favorecer a extração de todos os compostos. Assim, optou-se por adotar o menor volume de acetonitrila (4,00 mL), menor volume de água (3,00 mL) e maior força iônica (0,02 mol L⁻¹) a fim de promover maior recuperação dos analitos na extração por SLE/LTP em amostras de folhas de chá verde melhorando a sensibilidade do método.

4.3.2. Otimização do tempo de agitação, centrifugação e congelamento

Outros parâmetros importantes que devem ser otimizados para obter uma melhor extração pela técnica SLE/LTP são, o tempo de agitação, de centrifugação e de congelamento. Para avaliar a condição ótima para essas três variáveis um planejamento fatorial completo 2³ com triplicata no ponto central foi realizado, conforme descrito no item 3.7.4. Nesse planejamento, a área cromatográfica atribuída ao analito, determinada experimentalmente, foi utilizada como resposta para gerar os gráficos de Pareto. Estas respostas possibilitam verificar quais os efeitos e as interações que são estatisticamente significativas. Os gráficos de Pareto gerados para cada um dos pesticidas estão dispostos nas Figuras 12 e 13.

Figura 12. Gráficos de Pareto dos efeitos das variáveis tempo de agitação (1), tempo de centrifugação (2) e tempo de congelamento (3) para os pesticidas (A) pirimifós-metílico, (B) clorpirifós, (C) triadimenol e (D) flutriafol.

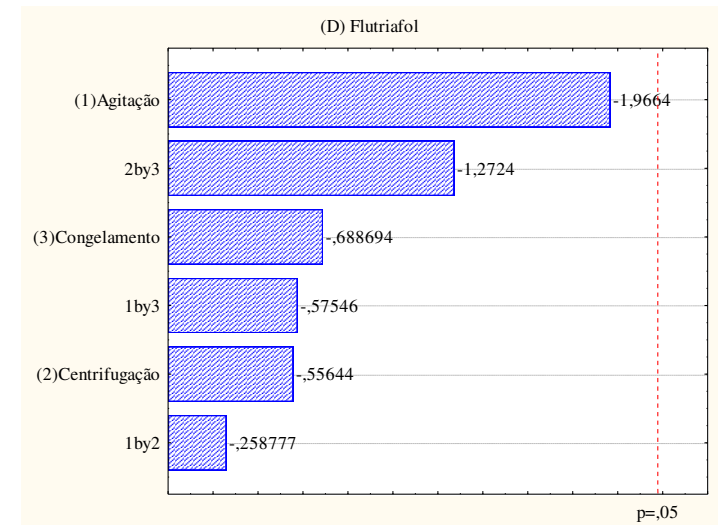
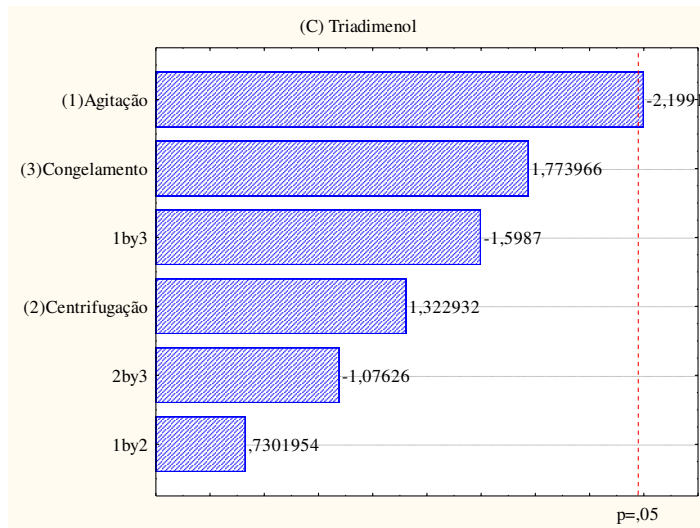
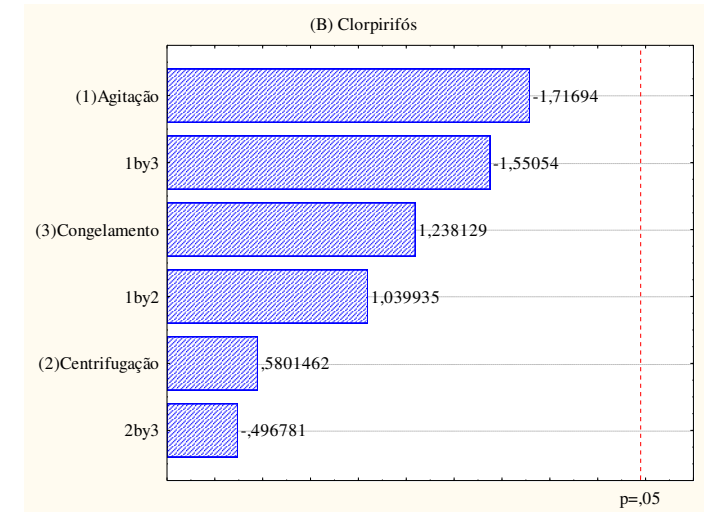
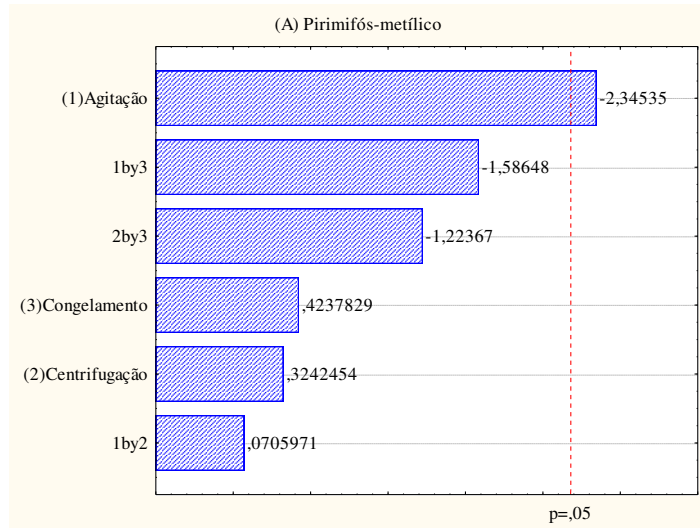
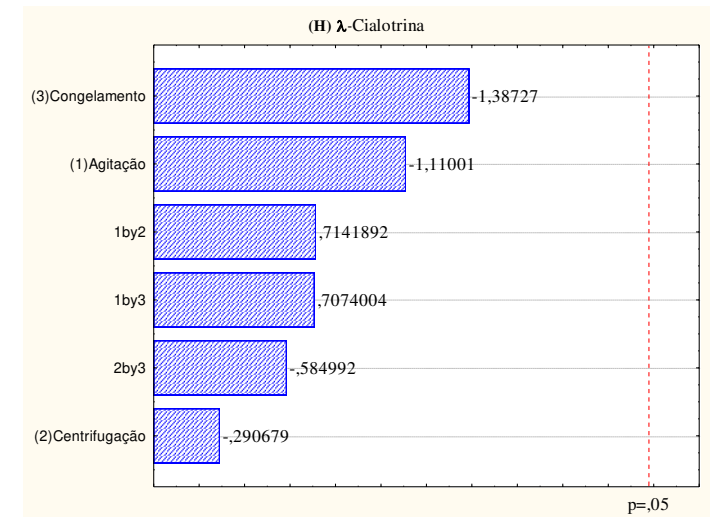
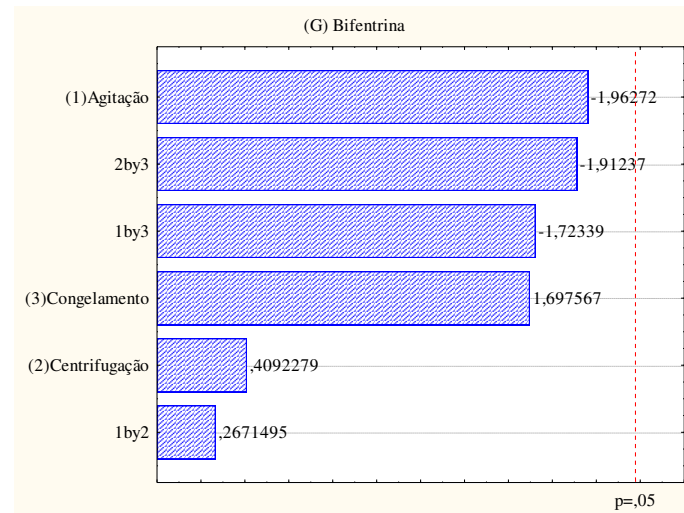
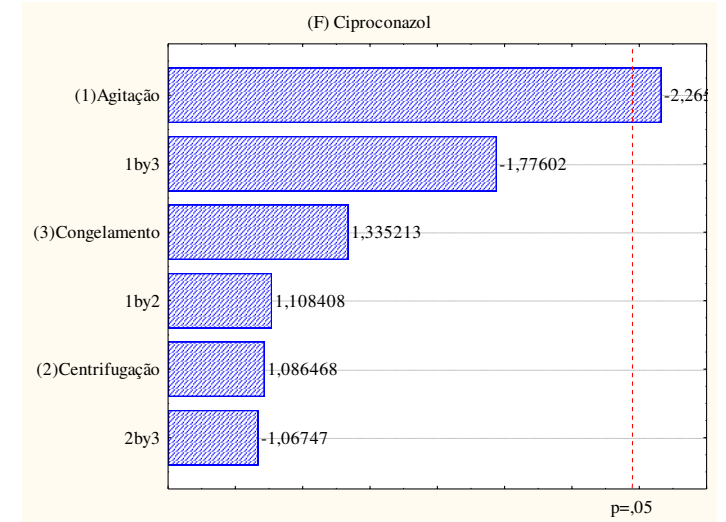
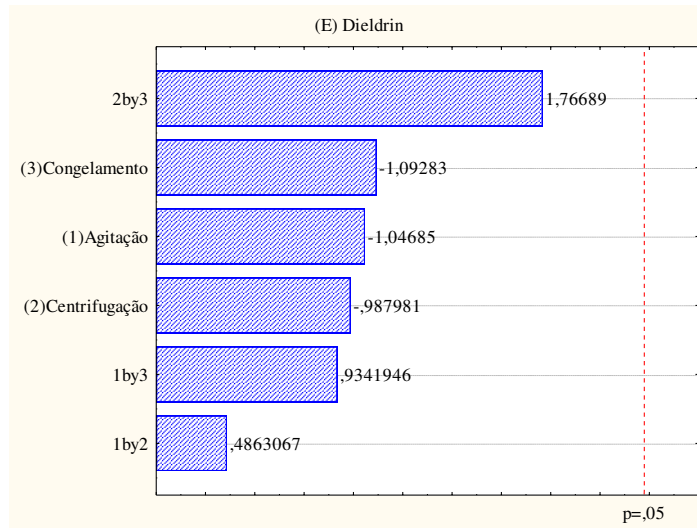


Figura 13. Gráficos de Pareto dos efeitos das variáveis tempo de agitação (1), tempo de centrifugação (2) e tempo de congelamento (3) para os pesticidas dieldrin, ciproconazol, bifentrina e λ -cialotrina.



A Tabela 7 apresenta um resumo com todos os analitos em estudo e os valores dos efeitos de cada uma das variáveis (tempo de agitação, centrifugação e congelamento) e da interação entre elas na otimização da SLE/LTP em folhas de chá verde.

Tabela 7. Pesticidas em estudo e seus respectivos valores dos efeitos de cada uma das variáveis e da interação entre elas na otimização do tempo de agitação, centrifugação e congelamento da SLE/LTP em folhas de chá verde.

Analitos	(1) Agitação	(2) Centrifugação	(3) Congelamento	1x2	1x3	2x3
Pirimifos-metílico	-2,34	NS	NS	NS	NS	NS
Clorpirifós	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Triadimenol	-2,20	NS	NS	NS	NS	NS
Flutriafol	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Dieldrin	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ciproconazol	-2,26	NS	NS	NS	NS	NS
Bifentrina	NS	NS	NS	NS	NS	NS
λ -Cialotrina	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS = não significativo.

A partir dos gráficos de Pareto, pode-se observar que o tempo de agitação (Fator 1), foi significativo negativo para o pirimifós-metílico, triadimenol e ciproconazol e não foi estatisticamente significativo para os demais pesticidas. Já os fatores tempo de centrifugação (Fator 2) e o tempo de congelamento (Fator 3) não foram estatisticamente significativos para os analitos em estudo.

Optou-se neste caso por se utilizar o menor tempo de agitação, uma vez que foi significativo negativo para três pesticidas e não significativo para os demais. O tempo de centrifugação e congelamento, não foram significativos para nenhum dos analitos em estudo, será utilizado neste caso o menor tempo de centrifugação e de congelamento.

Desse modo, foram consideradas as condições ótimas para a extração SLE/LTP em amostras de folha de chá verde, o tempo de agitação de 30 s, o tempo de centrifugação de 3 min e tempo de congelamento de 4 h para os pesticidas pirimifós-metílico, clorpirifós, triadimenol, flutriafol dieldrin, ciproconazol, bifentrina e λ -cialotrina.

Em resumo, o método SLE/LTP pode ser otimizado adicionando 4,0 mL de acetoneitrila e 3,0 mL de água a 1, g de uma amostra de folha de chá verde. Essa mistura deve

ser agitada por 30 segundos, centrifugada por 3 minutos a 560 g e depois armazenada em freezer a aproximadamente -20 °C por 4 horas. O extrato sobrenadante deve ser removido submetido a etapa de clean-up (d-SPE) e analisado por GC-MS. A técnica SLE/LTP otimizada requer pequenas quantidades de amostra e solvente extrator, o que reduz os riscos de contaminação e o desperdício de amostras.

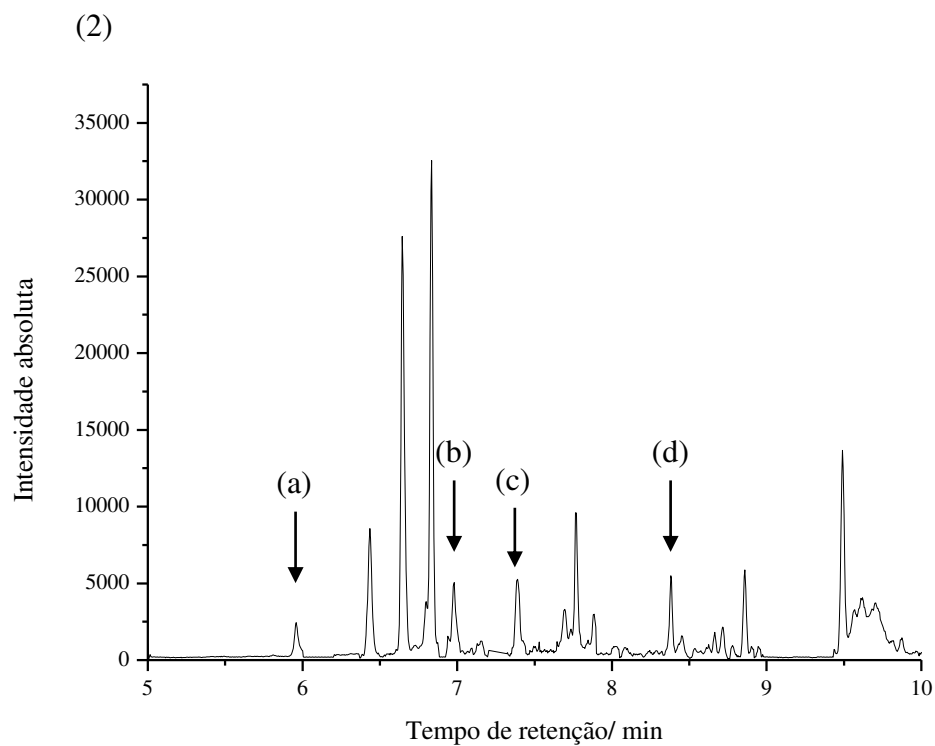
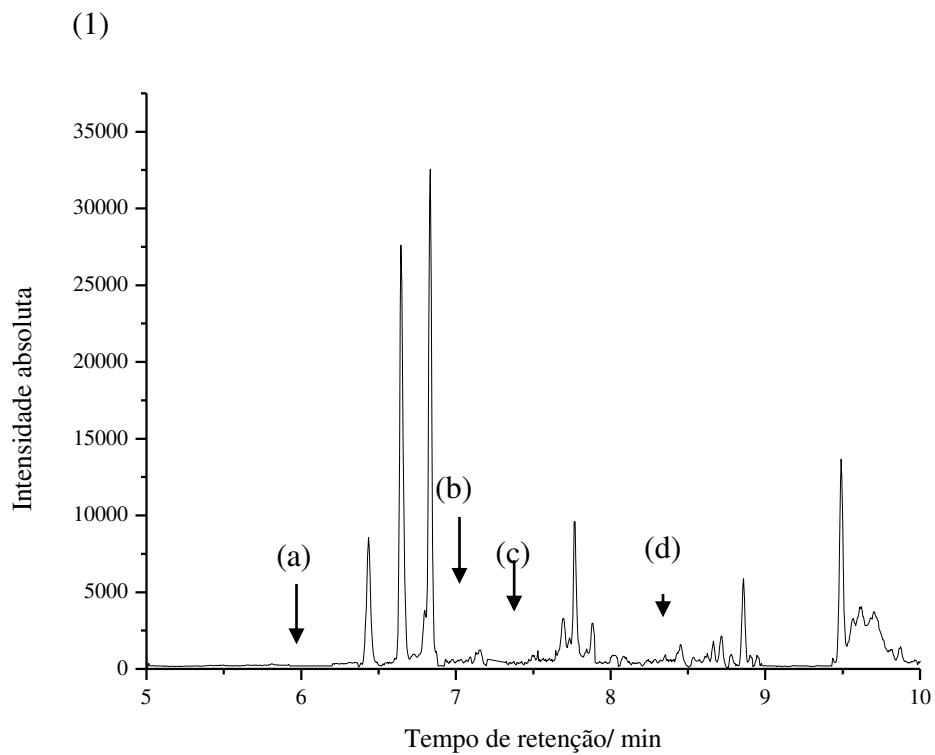
4.4. Validação do método SLE/LTP

Para avaliar o desempenho do método analítico, vários parâmetros foram considerados seguindo recomendações da Anvisa, 2017. Os parâmetros avaliados foram: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, exatidão, precisão e efeito de matriz.

4.4.1. Seletividade

Para a avaliação da seletividade do método otimizado, foi realizada a comparação entre o cromatograma obtido do extrato de amostras de folhas de chá verde isentas dos pesticidas (branco), com o do extrato das amostras de folha de chá verde fortificadas com concentração de 0,8 mg L⁻¹ para os pesticidas pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina (Figura 14). Esses cromatogramas foram obtidos pelo modo *SIM*, sendo selecionados três íons (um íon alvo e dois de referência) o qual possibilita diminuir o sinal de interferentes na matriz.

Figura 14. Cromatogramas, obtidos pelo GC-MS, de extrato das amostras de folha de chá verde. 1) isento dos analitos; (2) contendo os pesticidas, (a) pirimifós-metílico ($t_R = 5,96$ min), (b) flutriafol ($t_R = 6,98$ min), (c) ciproconazol ($t_R = 7,39$ min) e (d) bifentrina ($t_R = 8,38$ min).



Ao se analisar os cromatogramas, é possível observar que o método se mostra seletivo para análise dos quatro pesticidas avaliados. O extrato da folha de chá verde não apresentou interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos, o que torna o método otimizado seletivo para determinação de resíduo de pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina em amostras de folhas de chá verde.

4.4.2. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) para cada pesticidas foram determinados pela relação sinal-ruído. Para o limite de detecção, foi definida a concentração que proporcionou um sinal três vezes maior que o ruído. Já a concentração que proporcionou um sinal dez vezes maior que o ruído foi definido como o limite de quantificação.

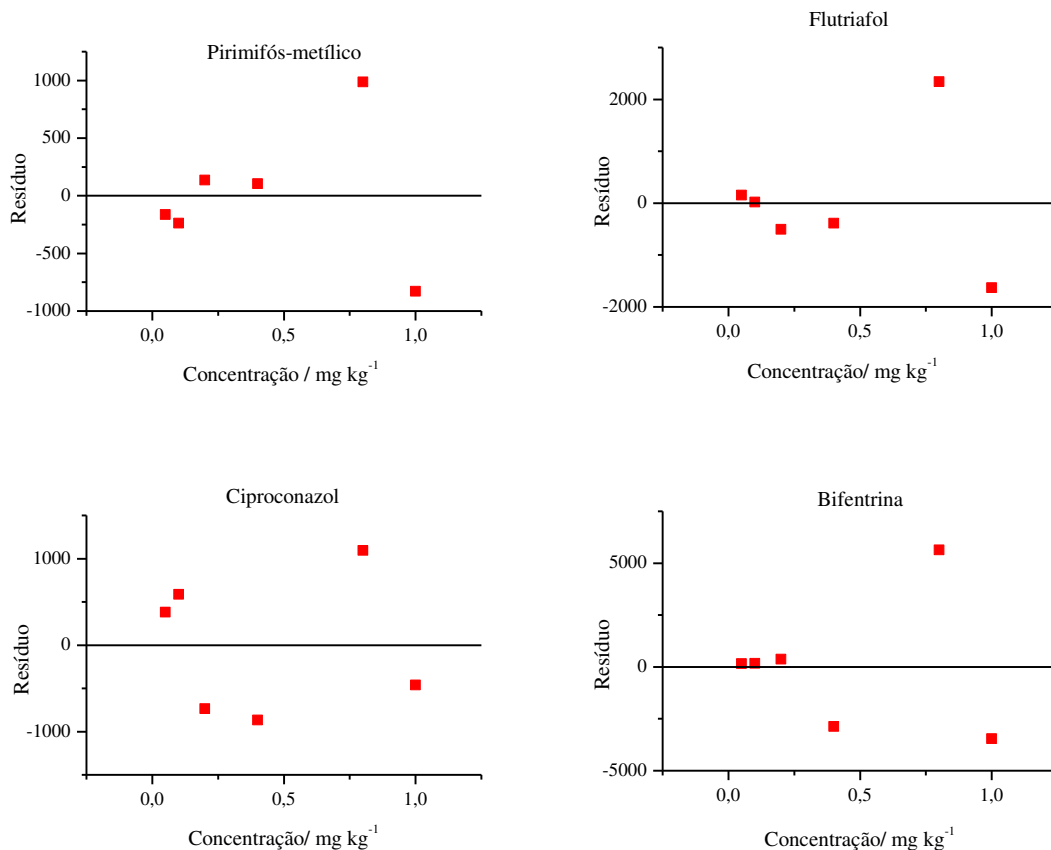
Para todos os analitos em estudo (pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina) foi definido um LQ e LD de $0,050 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,015 \text{ mg kg}^{-1}$ respectivamente. O valor do LMR permitido pelo União Europeia para os pesticidas analisados é igual ao LQ obtido nesse estudo.

4.4.3. Linearidade do método

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais às concentrações dos analitos (ANVISA, 2017). Esse parâmetro está restrito a uma faixa de concentração e pode ser expresso por uma equação de reta obtida através da curva analítica onde, segundo a Anvisa, 2017 o coeficiente de correlação deve ser maior ou igual a 0,990.

O método SLE/LTP-GC-MS otimizado foi aplicado em amostras de folhas de chá verde fortificadas com diferentes concentrações dos pesticidas pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina como descrito no item 3.8.3. Os parâmetros utilizados para avaliar a linearidade do método foram o coeficiente de determinação (R^2) e o gráfico de resíduo. Verifica-se na Tabela 8 que os valores de R^2 para todos os analitos encontram-se na faixa de 0,991-0,997, estando o coeficiente de correlação na faixa de 0,995-0,998, assim maiores que o valor estabelecido pelos parâmetros da Anvisa, 2017. Apesar desse parâmetro ser um bom indicativo de linearidade da resposta ele não é conclusivo. A distribuição dos resíduos deve ser também avaliada para confirmação dos resultados. Na Figura 15 são apresentados os gráficos de resíduos obtidos para cada pesticidas. Observa-se que os dados apresentam comportamento aleatório, indicando que o método desenvolvido é linear para os quatro pesticidas, dentro da faixa avaliada.

Figura 15. Gráficos de resíduos dos pesticidas pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina para as curvas analíticas em amostras de folha de chá verde.



4.4.4. Exatidão

A exatidão do método analítico SLE/LTP-GC-MS foi avaliada através de ensaios de recuperação conforme recomendação da Anvisa, 2017. Quantidades conhecidas de cada analito foram adicionadas às amostras de folha de chá em triplicata em três níveis de concentração (0,050; 0,40; 1,00 mg kg⁻¹) para os pesticidas pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina. Os resultados são apresentados na Tabela 8. Observa-se que a recuperação do método para amostras de chá verde variou de 81 a 107 %, estando dentro da faixa aceitável, pela Anvisa 2017, que é de 70 – 120%. Dessa maneira, o método desenvolvido apresenta boa exatidão, sendo adequado para extração e análise dos quatro pesticidas em estudo.

4.4.5. Precisão

A precisão mede o grau de dispersão entre os resultados obtidos ao se aplicar o método otimizado diversas vezes em uma mesma amostra. Pode ser expresso através do

desvio padrão ou coeficiente de variação (CV), também chamado de desvio padrão relativo (RSD) (ANVISA, 2017). Para esse estudo foram realizadas triplicatas de três diferentes concentrações (0,050; 0,40; 1,0 mg kg⁻¹).

4.4.6. Repetitividade

A repetitividade mede a dispersão dos resultados obtido pelo método otimizado em um curto intervalo de tempo, também chamado de precisão intra-dia (Anvisa, 2017). A repetitividade foi avaliada por ensaios realizados em triplicata em três diferentes concentrações (0,050; 0,40; 1,0 mg kg⁻¹). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 8.

Os resultados mostram uma boa repetitividade dos dados, onde o CV variou de 0,26-10,3% e em amostras complexas, como o chá verde, são aceitáveis coeficientes de variação de até 20% (ANVISA, 2017).

4.4.7. Precisão intermediária

A precisão intermediária do método foi avaliada aplicando-se o método otimizado em diferentes dias e em três níveis de concentração (0,05; 0,4; 1 mg kg⁻¹) com três repetições em cada nível. Os resultados obtidos (Tabela 8) mostram uma boa precisão inter-dia dos dados, pois os valores do coeficiente de variação variaram de 2,42-15,8 % sendo inferiores a 20%, considerados satisfatório de acordo com órgãos regulamentadores (ANVISA, 2017).

Tabela 8. Parâmetros de validação do método para pesticidas em amostras de folhas de chá verde: regressão linear ($y = \text{área}$, $x = \text{concentração em mg kg}^{-1}$), coeficiente de determinação (R^2), faixa linear, nível de fortificação (NF), percentual de recuperação e desvio padrão (% R \pm SD), precisões inter e intra-dia, e coeficiente de variação (CV).

Composto	Regressão linear / R^2	Faixa linear	LOD/LOQ	NF	$R^e \pm DP$ (%)	Intra-dia	Inter-dia
						CV (%) n = 3	CV (%) n = 9
Pirimifós- metílico	$y = 19323x + 381,56$ 0,994	0,050 – 1,0	0,015/0,05	0,050	81,0 \pm 0,003	5,76	9,23
				0,40	103 \pm 0,011	2,60	3,94
				1,0	99,4 \pm 0,019	1,91	2,42
Flutriafol	$y = 59714x - 364,52$ 0,997	0,050 – 1,0	0,015/0,05	0,050	83,2 \pm 0,001	1,51	15,8
				0,40	110 \pm 0,001	0,26	2,95
				1,0	106 \pm 0,036	3,55	2,99
Ciproconazol	$y = 32258x + 1660,6$ 0,996	0,050 – 1,0	0,015/0,05	0,050	82,6 \pm 0,039	9,75	14,6
				0,40	111 \pm 0,418	4,20	8,69
				1,0	105 \pm 0,993	10,3	6,53
Bifentrina	$y = 88875x + 1102$ 0,991	0,050 – 1,0	0,015/0,05	0,050	87,8 \pm 0,002	4,04	11,1
				0,40	107 \pm 0,029	6,78	8,31
				1,0	104 \pm 0,033	3,21	2,71

4.4.8. Efeito de matriz

O efeito de matriz foi analisado pelas curvas analíticas dos analitos preparados em solvente (acetonitrila) e em extrato orgânico da matriz (folhas de chá verde) submetida à técnica SLE/LTP. Ambas as curvas foram construídas nas concentrações 0,050; 0,10; 0,20; 0,40; 0,80; 1,0 mg kg⁻¹ para os quatro pesticidas (pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina). O efeito de matriz foi determinado de acordo com a equação 3, com base nas inclinações das curvas analíticas de cada pesticida preparada em extrato da matriz e no solvente como descrito no item 3.8.8.

A presença de coextrativos pode induzir variações significativas na resposta cromatográfica durante a análise dos pesticidas, influenciada pela matriz. Na Tabela 9, os resultados revelam um efeito positivo para todos os analitos, indicando um aumento no sinal cromatográfico. O aumento na resposta cromatográfica pode ser explicado pela presença de substâncias coextraídas da matriz. Esses compostos, geralmente predominantes na amostra, ocupam os sítios ativos na fonte de injeção, coluna e espectrômetro de massa, facilitando o alcance dos analitos ao detector sem perdas significativas. O mesmo não é observado quando os analitos estão dissolvidos em um solvente puro, isento de coextrativos da matriz que poderiam competir pelos sítios ativos do sistema cromatográfico. Como resultado, ocorre a perda de algum analito (no solvente), resultando em uma redução no sinal (HAJŠLOVÁ & ZROSTLIKOVA, 2003; PINHO *et al.*, 2012).

Tabela 9. Percentual do efeito de matriz (%EM) para cada pesticidas.

Analitos	%ME
Pirimifós-metílico	96,4
Flutriafol	45,7
Ciproconazol	28,0
Bifentrina	88,4

4.5. Aplicação do método

O método validado SLE/LTP-GC-MS foi aplicado para determinar os pesticidas pirimifos-metil, flutriafol, ciproconazol e bifentrina em folhas de chá verde e em diferentes amostras de chá provenientes das regiões Sul e Sudeste do Brasil. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

O pesticidas pirimifos-metil foi encontrado acima do LMR estabelecido pela União Europeia (0,05 mg kg⁻¹) em cinco amostras de chá (uma de chá preto, uma de chá branco e

três de erva-cidreira) em concentrações variando de 0,06-0,6 mg kg⁻¹. O flutriafol foi identificado em uma amostra de chá de cavalinha, porém abaixo do Limite de Quantificação (LQ) e, portanto, abaixo do LMR. Em relação ao ciproconazol, duas amostras de erva-cidreira, uma de erva-doce, uma de cavalinha e uma de hortelã apresentaram concentrações entre 0,11-0,85 mg kg⁻¹, todas excedendo o LMR. A bifentrina foi detectada em duas amostras de chá verde, uma de cavalinha, uma de mate e uma de capim-limão, com concentrações variando de <LQ a 0,20 mg kg⁻¹.

Estes resultados evidenciam a importância da análise de resíduos de pesticidas em chás, uma vez que várias amostras testadas continham esses resíduos, muitos dos quais ultrapassando os limites estabelecidos pela União Europeia.

5. CONCLUSÕES

O método SLE/LTP foi otimizado e validado para determinação de resíduos de pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) em amostras autênticas. A técnica pode ser considerada viável para análise dos analitos em folhas de chá verde desidratadas, apresentando porcentagem de recuperação de 81 a 111%, coeficiente de variação (CV) inferiores a 16% e limite de quantificação (LQ) igual a 0,050 mg kg⁻¹ para todos os pesticidas.

Diferentes amostras de chás foram analisadas e os pesticidas em estudo foram identificados estando, algumas, em concentrações que excedem os Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos pela União Europeia.

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que o método desenvolvido é eficaz na identificação e quantificação de resíduos de pesticidas em amostras de chás. Esses resultados evidenciam também a importância do monitoramento, por partes das agências reguladoras, de resíduos de pesticidas em amostras de chás.

6. REFERÊNCIAS

- ANVISA. RDC N. 166, de 25 de Julho de 2017. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, v. 2017, p. 1–21, 2017.
- CAO, Y., TANG, H., CHEN, D., LI, L. A novel method based on MSPD for simultaneous determination of 16 pesticide residues in tea by LC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 998–999, p. 72–79, 2015.
- CHACKO, S. M., THAMBI, P. T., KUTTAN, R., NISHIGAKI, I. Beneficial effects of green tea: A literature review. **Chinese Medicine**, v. 5, n. 1, p. 13, 2010.
- CHENG, T. O. All teas are not created equal. **International Journal of Cardiology**, v. 108, p. 301–308, 2006.
- CHENG, X., YAN, H., WANG, X., SUN, N., QIAO, X. Vortex-assisted magnetic dispersive solid-phase microextraction for rapid screening and recognition of dicofol residues in tea products. **Food Chemistry**, v. 162, p. 104–109, 2014.
- CHO, S. K., ABD EL-ATY, A. M., RAHMAN, M. M., CHOI, J. H., & SHIM, J. H. Simultaneous multi-determination and transfer of eight pesticide residues from green tea leaves to infusion using gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 165, p. 532-539, 2014.
- EUROPEAN COMMISSION. Pesticides database - European Commission (EU). Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>. Acesso em: 15 set. 2023.
- FAN, C.-L., CHANG, Q. -Y., PANG, G.-F., LI, Z.-Y., KANG, J. High-Throughput Analytical Techniques for Determination of Residues of 653 Multiclass Pesticides and Chemical Pollutants in Tea, Part II: Comparative Study of Extraction Efficiencies of Three Sample Preparation Techniques. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 96, n. 2, p. 432–440, 2013.
- FANG, J., SUREDA, A., SIVA, A. S., KHAN, F., XU, S., NABAVI, S. M. Trends of tea in cardiovascular health and disease: A critical review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 88, p. 385–396, 2019.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, v. 1, p. 1–903, 2019

FIEDLER, H., CHEUNG, C., WONG, M. PCDD/PCDF, chlorinated pesticides and PAH in Chinese teas. **Chemosphere**, v. 46, n. 9–10, p. 1429–1433, mar. 2002.

GOULART, S. M., QUEIROZ, M. E. L. R., NEVES, A. A., QUEIROZ, J. H. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1320–1323, 2008.

HAJŠLOVÁ, J. & ZROSTLIKOVA, 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.

HAYWARD, D. G., WONG, J. W., SHI, F., ZHANG, K., LEE, N. S., DIBENEDETTO, A. L., HENGEL, M. J. Multiresidue Pesticide Analysis of Botanical Dietary Supplements Using Salt-out Acetonitrile Extraction, Solid-Phase Extraction Cleanup Column, and Gas Chromatography–Triple Quadrupole Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 9, p. 4686-4693, 2013.

HAYWARD, D. G.; WONG, J. W.; PARK, H. Y. Determinations for Pesticides on Black, Green, Oolong, and White Teas by Gas Chromatography Triple-Quadrupole Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 37, p. 8116-8124, 2015.

HUANG, Y., SHI, T., LUO, X., XIONG, H., MIN, F., CHEN, Y., NIE, S., XIE, M. Determination of multi-pesticide residues in green tea with a modified QuEChERS protocol coupled to HPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, 2019.

HOU, X., LEI, S., GUO, L. QIU, S. Optimization of a multi-residue method for 101 pesticides in green tea leaves using gas chromatography tandem mass spectrometry. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 4, p. 401–407, 2016.

HUO, F., TANG, H., WU, X., CHEN, D., ZHAO, T., LIU, P., LI, L. Utilizing a novel sorbent in the solid phase extraction for simultaneous determination of 15 pesticide residues in green tea by GC/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1023–1024, p. 44–54, 2016.

IUPAC. Pesticide Properties Database. Disponível em: <https://sistem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/168.htn?fbclid=IwARICMVd_JXCj2NKZT97xCbgzFzDnsKw_nm9AFMMp4LV8cu6roHIFqTo>. Acesso em: 15 fev. 2022.

KHAN, N.; MUKHTAR, H. Tea polyphenols for health promotion. **Life Sciences**, v. 81, n. 7, p. 519–533, 2007.

KRISTENSON, E.; BRINKMAN, U.; RAMOS, L. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 96–111, 2006.

KWON, H., LEHOTAY, S. J., & GEIS-ASTEGGIANTE, L. Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography–mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops. **Journal of chromatography A**, v. 1270, p. 235-245, 2012.

LI, Y., CHEN, X., FAN, C., PANG, G. Compensation for matrix effects in the gas chromatography–mass spectrometry analysis of 186 pesticides in tea matrices using analyte protectants. **Journal of Chromatography A**, v. 1266, p. 131–142, 2012.

LIU, X., GUAN, W., HAO, X., WU, X., MA, Y., PAN, C. Pesticide Multi-Residue Analysis in Tea Using d-SPE Sample Cleanup with Graphene Mixed with Primary Secondary Amine and Graphitized Carbon Black Prior to LC–MS/MS. **Chromatographia**, v. 77, n. 1–2, p. 31–37, 2014.

Liu, X., Xu, J., Dong, F., Li, Y., Song, W., & Zheng, Y. Residue analysis of four diacylhydrazine insecticides in fruits and vegetables by Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) method using ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, p. 1051-1058, 2011.

LOZANO, A., RAJSKI, L., BELMONTE-VALLES, N., UCLÉS, A., UCLÉS, S., MEZCUA, M., FERNANDEZ-ALBA, A. R. Pesticide analysis in teas and chamomile by liquid chromatography and gas chromatography tandem mass spectrometry using a modified QuEChERS method: Validation and pilot survey in real samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1268, p. 109–122, 2012.

LU, C., LIU, X., DONG, F., XU, J., SONG, W., ZHANG, C., LI, Y., ZHENG, Y. Simultaneous determination of pyrethrins residues in teas by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 678, n. 1, p. 56–62, 2010.

LY, T.-K.; BEHRA, P.; NHU-TRANG, T.-T. Quantification of 397 pesticide residues in different types of commercial teas: Validation of high accuracy methods and quality assessment. **Food Chemistry**, v. 370, p. 130986, 2022.

Liu, W., Liu, F., Che, A., Chen, Y., Cai, J., Liu, W., JING, G., LI, W., & Yu, J.. Investigation of low-temperature partitioning with dispersive solid-phase extraction for quantification of pesticides in apples followed by electrospray-ionization mobility spectrometry: Comparison with conventional procedure. **Journal of Chromatography B**, v. 1234, p.124014, 2024.

MAHDAVI-ROSHAN, M., SALARI, A., GHORBANI, Z., ASHOURI, A. The effects of regular consumption of green or black tea beverage on blood pressure in those with elevated blood pressure or hypertension: A systematic review and meta-analysis. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 51, p. 102430, 2020.

MASTOVSKA, K. & LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, p. 259–272, 2004.

MOL, H. G. J., ROOSEBOOM, A., DAM, R. V., RODING, M., ARONDEUS, K., SNART, S. Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 6, p. 1715–1754, 2007.

NIE, S.-P.; XIE, M.-Y. A review on the isolation and structure of tea polysaccharides and their bioactivities. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 2, p. 144–149, 2011.

MIR, S. A., DAR, B. N., MIR, M. M., SOFI, S. A., SHAH, M. A., SIDIQ, T., SUNOOJ, K. V., HAMDANI, A. M., KHANEGHAH, A. M. Current strategies for the reduction of pesticide residues in food products. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2022.

MOINFAR, S.; HOSSEINI, M.-R. M. Development of dispersive liquid–liquid microextraction method for the analysis of organophosphorus pesticides in tea. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1–3, p. 907–911, 2009.

PINHO, G. P. D., SILVÉRIO, F. O., NEVES, A. A., & QUEIROZ, M. E. L. R. D. Evaluation of pesticide adsorption in gas chromatographic injector and column. **Química Nova**, 35, 738–742, 2012.

PINTO, M., S. Tea: A new perspective on health benefits. **Food research international**, v. 53, p.558-567, 2013.

PRESTES, O. D., FRIGGI, C. A., ADAIME, M. B., ZANELLA, R. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009.

RAJSKI, Ł., LOZANO, A., BELMONTE-VALLES, N., UCLÉS, A., UCLÉS, S., MEZCUA, M., FERNANDEZ-ALBA, A. R. Comparison of three multiresidue methods to analyse pesticides in green tea with liquid and gas chromatography/tandem mass spectrometry. **The Analyst**, v. 138, n. 3, p. 921–931, 2013.

RETO, M., FIGUEIRA, M. E., FILIPE, H. M., ALMEIDA, C. M. M. Chemical Composition of Green Tea (*Camellia sinensis*) Infusions Commercialized in Portugal. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 62, n. 4, p. 139–144, 2007.

SENGER, A. E. V., SCHWANKE, C. H. A., GOTTLIEB, M. G. V. Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. **Scientia Medica**, v. 20, n. 4, p. 292-300, 2010.

SHOEIBI, S. et al. An Applicable Strategy for Improvement Recovery in Simultaneous Analysis of 20 Pesticides Residue in Tea. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 5, p. 792–796, 2013.

SOLTANI, S.; SERESHTI, H. A green alternative QuEChERS developed based on green deep eutectic solvents coupled with gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of pesticides in tea samples. **Food Chemistry**, v. 380, p. 132181, 2022.

SONG, L., ZENG, W., LI, A., PAN, C., PAN, L. Automated multi-plug filtration cleanup method for analysis of 48 pesticide residues in green tea using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Control**, v. 131, p. 106436, 2022.

STEINIGER, D., LU, G., BUTLER, J., PHILLIPS, E., FINTSCHENKO, Y. Determination of Multiresidue Pesticides in Green Tea by Using a Modified QuEChERS Extraction and Ion-Trap Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 93, n. 4, p. 1169–1179, 2010.

VÁZQUEZ, P. P., FERRER, C., BUENO, M. J. M., FERNANDEZ-ALBA, A. R. Pesticide residues in spices and herbs: Sample preparation methods and determination by chromatographic techniques. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 115, p. 13–22, 2019.

WU, Y., NA, Q., LI, D., KANG, C., ZHANG, J., PAN, C. Multi-residue analytical method development and risk assessment of 56 pesticides and their metabolites in tea by chromatography tandem mass spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 375, p. 131819, 2022.

XU, C., LIANG, L., LI, Y., YANG, T., FAN, Y., MAO, X., WANG, Y. Studies of quality development and major chemical composition of green tea processed from tea with different shoot maturity. **LWT**, v. 142, p. 111055, 2021.

ZHANG, X., MOBLEY, N., ZHANG, J., ZHENG, X., LU, L., RAGIN, O., SMITH, C., J. Analysis of Agricultural Residues on Tea Using d-SPE Sample Preparation with GC-NCI-MS and UHPLC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 22, p. 11553–11560, 2010.

ZHAO, P., WANG, L., JIANG, Y., ZHANG, F., PAN, C. Dispersive Cleanup of Acetonitrile Extracts of Tea Samples by Mixed Multiwalled Carbon Nanotubes, Primary Secondary Amine, and Graphitized Carbon Black Sorbents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 16, p. 4026–4033, 2012.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM INFUSÃO DE CHÁ VERDE E AVALIAÇÃO DA TRANSFERÊNCIAS DAS FOLHAS PARA A INFUSÃO

RESUMO

O chá verde tem sido uma das bebidas mais consumidas no mundo, sendo preparado através da infusão das folhas da *Camellia sinensis* em água quente. Para aumentar a produtividade e proteger as plantas de certas doenças e pragas, se faz necessário o uso de pesticidas. Durante o processo de preparação do chá, além do sabor e aroma característicos, é possível que resíduos de pesticidas presentes nas folhas sejam transferidos para a bebida. Investigar a possibilidade de transferência desses pesticidas das folhas para a bebida é essencial para avaliar os riscos associados à ingestão de bebidas contaminadas pelos consumidores. Para avaliar esses riscos foi desenvolvido um método para determinação de resíduos de pesticidas em infusões obtidas no preparo de chá verde. O método extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP) e análise por GC-MS foi otimizado e validado e, posteriormente, aplicado para investigar a transferência de pesticidas, para a infusão. Para este estudo foram selecionados os pesticidas pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina, os quais são permitidos para a cultura de chá segundo a União Europeia. Os resultados indicaram que o método LLE/LTP-GC-MS é eficiente para a extração dos analitos nas amostras de infusão de chá verde, mostrando-se seletivo e com limite de detecção e quantificação de $0,004 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,0125 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente para os compostos estudados. O método também apresentou porcentagem de recuperação variando de 86,0 - 102 % e coeficiente de variação (CV) <17,8. A taxa de transferência dos resíduos de pesticidas da folha de chá verde depende da temperatura de infusão, variando de 11,4 – 24,7% para o pirimifós-metílico, 47,0 – 67,3% para o ciproconazol e <LQ – 3,73% para a bifentrina. A taxa de transferência para a bebida foi amplamente influenciada por parâmetros físico-químicos, como solubilidade em água e coeficiente de partição octanol-água. Temperaturas mais alta da água favorecem a transferência dos pesticidas das folhas para a infusão.

1. INTRODUÇÃO

O chá é amplamente reconhecido como uma bebida de grande popularidade em várias partes do mundo, valorizado não apenas por seu sabor refrescante, mas também por seus potenciais benefícios para a saúde (RAMESHRAD *et al.*, 2017). Entre todos os tipos de chá, o chá verde está entre os que oferecem maiores benefícios para a saúde. O chá possui polifenóis, ácido tânico e antioxidantes que estão relacionados à diminuição do risco de várias doenças, incluindo câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e neurológicas, além de exibir efeitos positivos no combate ao envelhecimento (PINTO, 2013). Em função disso, o chá verde tem sido incluído em alimentos funcionais com o objetivo de diminuir várias doenças, o que incentivou o aumento da sua produção mundial para atender à demanda da população (SARMA, BANIA & DAS, 2023).

Para minimizar as perdas na cultura, pesticidas são utilizados para controlar diversos tipos de pragas e doenças. Portanto, folhas de chá verde podem ser expostas a uma variedade de pesticidas, os quais podem ser absorvidos, translocados, ou retidos nas folhas (GURUSUBRAMANIAN *et al.*, 2008). Esses, por sua vez, dependendo de suas propriedades e características, podem ser transferidos para a infusão e conseqüentemente para o consumidor (CHEN *et al.*, 2017).

A infusão refere-se ao método de obtenção dos componentes químicos presentes nas plantas por meio da imersão delas em água, onde o calor é empregado para facilitar esse processo (JÄGER *et al.*, 2010). Geralmente, as infusões são preparadas com 1 a 3 gramas de chá, deixando-os em infusão em 100 a 150 mL de água quente por aproximadamente 5 a 6 min (Chen *et al.*, 2017).

O interesse na transferência dos pesticidas durante a preparação do chá (infusão) tem aumentado pois, a água quente pode extrair resíduos de determinados pesticidas que são transferidos para a bebida juntamente com seu sabor e aroma (JIANG *et al.*, 2020; FANG *et al.*, 2022). Entretanto, a transferência completa dos pesticidas nem sempre ocorre, sendo que essa taxa de transferência está intimamente ligada ao tipo de planta e também com às suas características físico-químicas. Como a água é o principal transportador de pesticidas para a infusão, a solubilidade em água é um dos fatores primordiais que influencia o comportamento da transferência dos pesticidas durante a preparação do chá. Outro fator importante é o coeficiente de partição (Kow). Pesticidas com alto Kow tendem a se ligar firmemente às estruturas das folhas do chá, impedindo sua transferência para a água. Estudos têm demonstrado que a taxa de transferência está positivamente correlacionada com a solubilidade

em água (Ws) e negativamente com o log Kow (CHEN *et al.*, 2017; XIAO *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2019).

Os limites máximos de resíduos (LMRs) para os pesticidas segundo a União Europeia e a Farmacopéia Brasileira são fixados para as folhas, porém, a exposição real se dá através do consumo da bebida. Geralmente, os chás são infundidos em água fervente antes que a bebida seja consumida, visando a transferência de vários compostos presentes na composição química das folhas, como flavonoides, catequinas, polifenóis, alcaloides, vitaminas e sais minerais. Entretanto, como esse procedimento, pode levar também à transferência de compostos indesejáveis como os pesticidas para a infusão, se torna imprescindível investigar cuidadosamente essa transferência, bem como desenvolver métodos analíticos confiáveis para determinação de pesticidas em infusão de chás (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2019; SZTERNFELD *et al.*, 2023).

Alguns métodos são descritos na literatura para determinar resíduos de pesticidas em infusões de diferentes tipos de chás como QuEChERS e extração com hexano. No entanto, esses métodos demandam muitas etapas de preparo da amostra, tornando-os caros, demorados e com o consumo de grandes volumes de amostra e solvente orgânico (WANG *et al.*, 2019; SZTERNFELD *et al.*, 2023).

A técnica extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP) tem demonstrado excelentes resultados e vem sendo amplamente empregada para determinação de pesticidas em diversas amostras como, urina (SILVA *et al.*, 2022), água (RODRIGUES *et al.*, 2018), mel (PINHO *et al.*, 2010), leite (GOULART *et al.*, 2008) e outras matrizes. Essa técnica apresenta vantagens como o baixo consumo de solvente e amostra, simplicidade, e a ausência de etapas de *clean-up* no preparo de várias amostras, geralmente requerida em vários outros métodos de extração. O procedimento consiste em combinar uma quantidade específica de amostra líquida com um solvente extrator miscível, que seja menos denso que a água e permaneça líquido a -20 °C. Essa mistura é agitada e levada ao freezer, a fase aquosa solidifica e se deposita na parte inferior do recipiente, enquanto a fase superior, contendo solvente e os pesticidas, permanece líquida. Esta camada superior é então recolhida e analisada por cromatografia (GOULART *et al.*, 2008).

No Brasil, os chás, como o chá verde, são muito usados na medicina popular, como antioxidantes, antialérgicos, bem como para reduzir a incidência de doenças crônicas. Além disso, chás têm sido consumidos também como um hábito diário, como por exemplo o chimarrão, que é uma das infusões mais populares consumida na região sul. Esse consumo e a

demanda mundial pelas infusões de chás reforçam a importância de se desenvolver métodos de menor custo para determinação de resíduos de pesticidas em infusões de chás.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo i) otimizar e validar o método extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (LLE/LTP-GC-MS) para determinação de diferentes pesticidas em infusão de chá verde e ii) avaliar a taxa de transferência desses pesticidas das folhas de chá verde desidratadas para a infusão (chá pronto).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Otimizar e validar o método extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (LLE/LTP-GC-MS) para determinar resíduos de pesticidas em infusões de chá verde e verificar a transferência dos pesticidas pirimifós-metílico, ciproconazol e bifentrina da folha de chá verde desidratada para a sua infusão em diferentes condições de preparo.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar as condições cromatográficas para análise dos pesticidas pirimifós-metílico, clorpirifós, triadimenol, flutriafol, dieldrin, ciproconazol, bifentrina e λ -cialotrina por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS);
- Otimizar a extração desses pesticidas em amostras de chá pronto, preparadas através da infusão de folhas de chá verde, utilizando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP);
- Validar o método (LLE/LTP-GC-MS) otimizado;
- Aplicar o método otimizado e validado para a determinação de resíduos de pesticidas em infusões de folhas de chá verde desidratadas, utilizando a técnica LLE/LTP.
- Avaliar a transferência de três pesticidas (pirimifós-metílico, ciproconazol e bifentrina) da folha de chá verde para a infusão em diferentes condições de preparo (tempo de infusão e temperatura da água de preparo).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Princípios ativos e soluções padrão

Os seguintes padrões analíticos de pesticidas foram utilizados no decorrer deste estudo: pirimifos-metílico (pureza = 99,5% m/m, Sigma-Aldrich), clorpirifós (pureza = 99,0% m/m, Syngenta), triadimenol (pureza = 99,0% m/m, Dr. Ehrenstorfer GmbH), flutriafol (pureza = 97,0% m/m, Sigma-Aldrich), dieldrin (pureza = 99,8%, Sigma-Aldrich), ciproconazol (pureza = 99,8%, Sigma-Aldrich), bifentrina (pureza = 92,2% m/m, FMC), λ -cialotrina (pureza = 95,0% m/m, Sigma-Aldrich).

Soluções estoque desses padrões foram preparadas na concentração de 1000 mg L⁻¹ em acetonitrila 99,9% grau HPLC (Sigma-Aldrich). As demais soluções de trabalho utilizadas foram preparadas a partir de solução estoque, através de diluições. Todas as soluções utilizadas neste estudo foram armazenadas em freezer à temperatura de aproximadamente - 20 °C (± 2 °C). Também foi utilizado neste estudo sulfato de sódio (Na₂SO₄) (VETEC, Brasil).

Foi também preparada uma calda com os produtos comerciais Actellic® 500EC (Syngenta) que contém o princípio ativo pirimifós-metílico (500 g L⁻¹), Alto 100 (Syngenta) contendo o princípio ativo ciproconazol (100 g L⁻¹) e Talstar 100EC (FMC) que contém o princípio ativo bifentrina (100 g L⁻¹).

3.2. Equipamentos

As análises foram conduzidas utilizando um cromatógrafo a gás da Shimadzu, equipado com um detector espectrômetro de massas (GCMS-QP2010) do tipo quadrupolo. O sistema incluiu um autoinjeter (AOC-20i, Shimadzu). Além disso, empregou-se um banho ultrassônico operado a 280W e 40 kHz (modelo Sanders), uma balança analítica Shimadzu AUY 220, um agitador vortex Certomat® MV, uma centrífuga Quimis® ISO 8001, um espectrofotômetro BEL 1105 e um freezer de 280 L (Consul, Minas Gerais, Brasil).

3.3. Condições Cromatográficas

As condições cromatográficas (programação de aquecimento da coluna cromatográfica, temperatura do injetor e do detector, modo de injeção e a vazão do gás de arraste) foram otimizadas com o objetivo de se obter uma boa resolução e separação dos picos dos pesticidas com um menor tempo de análise.

As condições ideais da análise por GC-MS se encontram descritas a seguir:

- Coluna capilar (SH-Rtx-5MS) com fase estacionária composta por 5% de fenil e 95% de dimetilpolissiloxano (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura do filme);
- Gás de arraste: hélio (pureza 99,999%, White Martins);
- Vazão do gás de arraste: 1,17 mL min^{-1} ;
- Volume injetado: 1,0 μL ;
- Modo de injeção: splitless;
- Temperatura do injetor: 300 $^{\circ}\text{C}$;
- Programação de aquecimento da coluna:
160 $^{\circ}\text{C}$ (1 min), aquecimento em uma taxa de 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 290 $^{\circ}\text{C}$ (2,5 min).
- Tempo total de análise: 10 min
- Temperatura do detector: 300 $^{\circ}\text{C}$;
- Fonte de ionização: impacto de elétrons de 70 eV;
- Analisador: *single quadrupole*; Temperatura: 150 $^{\circ}\text{C}$
- Temperatura de interface: 300 $^{\circ}\text{C}$;
- Temperatura da fonte de ionização: 230 $^{\circ}\text{C}$;
- Tempo de corte: 5 min.

Inicialmente, uma análise no modo Scan ou TIC (total ion chromatogram - cromatograma de íons totais) foi realizada para obter os tempos de retenção (tR) e os espectros de massas de todos os pesticidas em estudo. Os espectros de massa foram obtidos no modo SCAN na faixa m/z de a 50 a 500. Posteriormente, os três fragmentos de íons de maior intensidade foram selecionados para cada pesticidas, para definir as condições para o modo de monitoramento seletivo de íons (SIM).

3.4. Amostras de chá para a infusão

Para a condução da otimização e validação do método de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura, foram adquiridas amostras de folhas de chá verde desidratadas no mercado de Viçosa-MG. Essas foram utilizadas para preparação das infusões. A ausência de pesticidas na infusão foi confirmada por meio de análise utilizando o GC-MS.

Para as etapas de otimização e validação, a matriz (infusão) foi fortificada com uma solução padrão, preparada em acetonitrila, contendo os analitos em estudo.

3.5. Preparo e fortificação das amostras de infusão de chá verde

As infusões de chá verde foram preparadas colocando 1,0 grama das folhas, pesada em balança analítica, em contato, por 5 min, com 100,0 mL de água aquecida a 100 °C.

Volumes de chá pronto (infusão) foram adicionados em frascos de vidros com tampa plástica, com capacidade de 22,00 mL e fortificadas com 0,1 mL da solução de trabalho contendo os oitos pesticidas (pirimifos-metílico, clorpirifós, triadimenol, flutriafol, dieldrin, ciproconazol, bifentrina, λ -cialotrina) na concentração de 32 mg L⁻¹. Essas amostras fortificadas foram agitadas em vórtex durante 10 s e deixadas em repouso por duas horas, de maneira a conseguir uma melhor interação dos pesticidas com a amostra. Posteriormente as amostras foram submetidas ao processo de extração, para estabelecer as condições ótimas para determinação dos oitos pesticidas em estudo por GC-MS.

3.6. Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP)

3.6.1. Extração dos pesticidas por (LLE/LTP) - Técnica geral

Para a técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura, a um certo volume de amostra de infusão de chá verde fortificada foram adicionados, uma certa massa de sal (Na₂SO₄) e um volume de acetonitrila. Essa mistura foi agitada em vórtex e levadas ao freezer a -20 °C por um certo tempo. Após algumas horas de geladeira 1,00 mL da fase orgânica foi recolhido e colocado em um “vial” e analisado por GC-MS.

Os parâmetros, volume de amostra, volume de acetonitrila, força iônica, tempo de agitação e tempo de congelamento foram otimizados para se obter melhor eficiência na extração dos pesticidas em estudo.

3.6.2. Otimização da técnica de LLE-LTP

No processo de otimização da técnica LLE/LTP alguns parâmetros importantes para análise dos pesticidas em estudo foram avaliados procurando-se obter os melhores rendimentos com menor tempo de análise e baixo custo. Neste trabalho, duas otimizações foram propostas, a primeira para avaliar o volume da amostra de infusão, o volume de solvente extrator e a força iônica e a segunda para avaliar os melhores tempos de agitação e congelamento.

3.6.3. Otimização dos parâmetros volume de amostra, volume do solvente extrator e força iônica na LLE/LTP-GC-MS

O primeiro planejamento foi realizado a fim de otimizar o volume de amostra (3,0; 4,0; 5,0 mL), o volume de solvente extrator (4,0; 5,0; 6,0 mL) e a força iônica (0; 0,01; 0,02 mol L⁻¹) de maneira a obter uma melhor condição para extração dos pesticidas. Optou-se por realizar uma otimização multivariada, empregando um planejamento fatorial completo 2³ com ponto central (n=3), onde todos os fatores são alterados e analisados simultaneamente em cada experimento, levando em conta as interações entre eles. A força iônica, foi avaliada utilizando sulfato de sódio (Na₂SO₄). Essa mistura foi agitada em vórtex por 60s e levada ao freezer por 6 h a -20 °C para separação das fases. O extrato sobrenadante foi analisado por GC-MS. As áreas relativas obtidas nas análises foram utilizadas como respostas analíticas.

Os dados do planejamento são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Planejamento fatorial 2³ com ponto central (n=3) aplicado na otimização do volume de acetonitrila, volume de amostra e força iônica para LLE/LTP usada na extração de pesticidas presentes em amostras de infusão de chá verde.

Variáveis	Níveis		
	(-1)	(0)	(+1)
Força iônica (mol/l)	0	0,01	0,02
Volume de amostra (mL)	3	4	5
Volume de acetonitrila (mL)	4	5	6

Ensaio	Fatores codificados		
	Força iônica	Volume de amostra	Volume de acetonitrila
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

3.6.4. Otimização do tempo de agitação e congelamento para LLE/LTP

O segundo planejamento foi realizado a fim de otimizar o tempo de agitação (30 s, 45 s e 60 s) e tempo de congelamento (4 h, 5 h e 6 h) de maneira a obter uma melhor extração. Para avaliar a melhor condição para essas duas variáveis foi empregado um planejamento fatorial completo 2^2 com ponto central ($n=3$). Os dados deste planejamento estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Planejamento fatorial 2^2 aplicado para otimização do tempo de agitação e tempo de congelamento usada na LLE/LTP em amostras de infusão de chá verde.

Variáveis		Níveis		
		(-1)	(0)	(+1)
Tempo	Agitação (s)	30	45	60
	Congelamento (h)	4	5	6

Ensaio	Fatores Codificados	
	Agitação	Congelamento
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+
5	0	0
6	0	0
7	0	0

As áreas relativas obtidas nas análises foram utilizadas como respostas analíticas. Após a otimização do método para determinação de resíduos de pesticidas em infusões de chá verde, este foi validado.

3.7. Validação do método LLE/LTP-GC-MS

O método LLE/LTP-GC-MS otimizado foi validado apenas para os pesticidas pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina em infusão de chá devidos a problemas com o GC-MS, onde a sensibilidade foi alterada durante a pesquisa. O método passou pelo processo de validação de acordo com os critérios estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), conforme a Resolução RDC nº 166/17 (ANVISA, 2017). As figuras de mérito avaliadas incluíram seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite

de quantificação (LQ), exatidão (por meio de ensaios de recuperação), precisão (considerando repetitividade e precisão intermediária) e o efeito de matriz.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) para cada analito foi determinado pela relação sinal-ruído. A concentração que proporcionou um sinal três vezes maior que o ruído foi considerado como sendo o limite de detecção. Já o limite de quantificação, foi definido como a concentração que proporcionou um sinal dez vezes maior que o ruído.

A linearidade foi avaliada pela curva analítica obtida pela injeção de extratos obtidos da infusão fortificada em concentrações dos quatro analitos variando de 0,0125-0,25 mg L⁻¹ (n = 18, seis pontos em triplicata). A relação matemática entre o sinal (resposta) e a concentração dos analitos foi expressa pela equação da curva analítica e o seu coeficiente de determinação (R²). Com base no coeficiente de determinação (R²) e nos gráficos de resíduos foram firmados a linearidade do método proposto.

A exatidão foi determinada por meio de ensaios de recuperação, nos quais quantidades conhecidas dos analitos foram adicionadas à amostra em triplicata, em três diferentes concentrações (0,0125; 0,1 e 0,25 mg L⁻¹). Os resultados foram expressos como a porcentagem, de recuperação.

A precisão foi expressa em termos de repetitividade e precisão intermediária. Para a repetitividade, as amostras foram fortificadas, em triplicatas, em três diferentes concentrações (0,0125; 0,1 e 0,25 mg L⁻¹). Para a precisão intermediária, as amostras foram fortificadas, em triplicatas, em três concentrações (0,0125; 0,1 e 0,25 mg L⁻¹), ao longo de três dias não consecutivos, e os resultados foram expressos pelo coeficiente de variação (CV).

O efeito de matriz pode ser avaliado comparando os parâmetros de curvas analíticas obtidas a partir de soluções padrão preparadas no extrato da matriz e a partir de soluções padrão preparadas em solvente puro nas mesmas concentrações. Neste estudo, o efeito de matriz (%EM) foi calculado através da inclinação da curva analítica de cada pesticida preparada no extrato da matriz (a_E) e da inclinação da curva analítica de cada pesticida preparada em solvente puro (a_S), conforme Equação 1. As soluções foram preparadas nas concentrações 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,25 mg L⁻¹.

$$\%EM = \left[\frac{a_E - a_S}{a_S} \right] \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde,

a_E = Inclinação da curva analítica de cada pesticida preparada em extrato da matriz;

a_s = Inclinação da curva analítica de cada pesticida preparada em solvente puro.

3.8. Aplicação do método LLE/LTP-GC-MS em amostras comerciais

O método LLE/LTP-GC-MS validado, foi aplicado para determinação dos pesticidas (pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina) em seis amostras de infusão de chá verde. Todas as infusões foram preparadas através de folhas de chá verde obtidas do comércio de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas.

3.9. Fortificação das folhas de chá verde para estudo de transferência

As folhas inteiras de chá verde desidratadas, isentas de pesticidas, utilizadas neste estudo foram adquiridas no mercado de Viçosa-MG e foram consideradas como o branco da matriz. A ausência de pesticidas nestas amostras foi confirmada por GC-MS. Essas amostras (folhas inteiras) foram pulverizadas com solução aquosa (calda) contendo os produtos comerciais Actellic 500EC (500 g L⁻¹), Alto 100 (500 g L⁻¹) e Talstar 100EC (100 g L⁻¹), utilizando um pulverizador costal manual, ponta XR11001. A pressão foi mantida a 200 KPa. A dose utilizada foi de 1,0 L/ha para o pirimifós-metílico e 3,0 L/ha para ciproconazol e bifentrina. Após a pulverização, as amostras foram deixadas em estufa por 24 h. Passado esse período, essas amostras foram armazenadas em recipiente vedado para evitar qualquer tipo de contaminação e armazenadas em geladeira para posterior análise.

3.10. Quantificação dos pesticidas presentes nas folhas de chá

A contaminação das folhas de chás com os pesticidas (pirimifós-metílico, ciproconazol e bifentrina) foi avaliada antes de serem usadas para o estudo de transferência. As amostras foram homogeneizadas e parte destas folhas de chá verde (mais ou menos 10,0 g) foram trituradas, peneiradas e submetidas ao método SLE/LTP já otimizado e validado para extração dos pesticidas. Para esse método cerca de 1,000 g de chá foi pesado em um frasco com capacidade de 22,00 mL. Em seguida foi adicionado a ele 3,00 mL de água, 4,00 mL de acetonitrila e força iônica de 0,02 mol L⁻¹ (utilizando Na₂SO₄). As amostras obtidas foram agitadas em vórtex por 30 s. Após a agitação as amostras foram submetidas à centrifugação a 560 g por 3 min e colocadas em freezer a -20 °C por 4 h. Após esse tempo a fase superior (fase orgânica) foi recolhida e submetida ao processo de *clean-up* (d-SPE), em que 1,5 mL da fase orgânica foi adicionada a um frasco contendo 125 mg de uma mistura dos adsorventes PSA/C18 (1:1 m/m). A amostra foi agitada em vórtex por 1 min e centrifugada por 4 min. Em seguida, 1,00 mL da fase superior foi recolhida e analisada por GC-MS. O estudo foi realizado em triplicata.

Uma curva analítica foi preparada, fortificando a matriz, nas concentrações 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0 mg kg⁻¹ para cada analito para determinar a quantidade de pesticidas alvo presente na matriz (folha). As amostras foram armazenadas em freezer até o momento da análise cromatográfica.

3.11. Estudo da transferência dos pesticidas das folhas de chá verde para as infusões

Neste estudo foram avaliados os parâmetros temperatura e tempo de preparo dos chás.

Para avaliar a transferência dos pesticidas, infusões foram preparadas, em triplicata, em diferentes condições. Inicialmente, massas de aproximadamente 1,0 g de folhas de chá verde foram medidas em recipientes de vidro e colocadas em contato com 100,00 mL de água nas temperaturas de 80 °C e 100 °C por diferentes tempos: 5, 15, 30 e 60 min. Durante o preparo, os frascos foram cobertos com papel alumínio.

Após o processo de infusão, as soluções de chá foram submetidas ao método LLE/LTP-GC-MS otimizado e validado. Uma curva analítica preparada fortificando a matriz foi utilizada para determinar a quantidade de pesticidas alvo presente na matriz (infusão). A curva foi construída na faixa de concentração de 0,0125-0,25 mg L⁻¹.

A taxa de transferência de cada pesticidas da amostra de folha de chá verde para cada infusão foi calculada pela seguinte Equação 2:

$$\text{Porcentagem de transferência (\%)} = \frac{C_{inf.} \cdot V}{C_{folha} \cdot M} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde,

C_{inf} é a concentração do pesticida na infusão de chá (mg L⁻¹),

V é o volume de infusão de chá (L);

C_{folha} é a concentração do pesticida presente na folha de chá (mg kg⁻¹);

M é a massa de folha de chá usada para a infusão (kg).

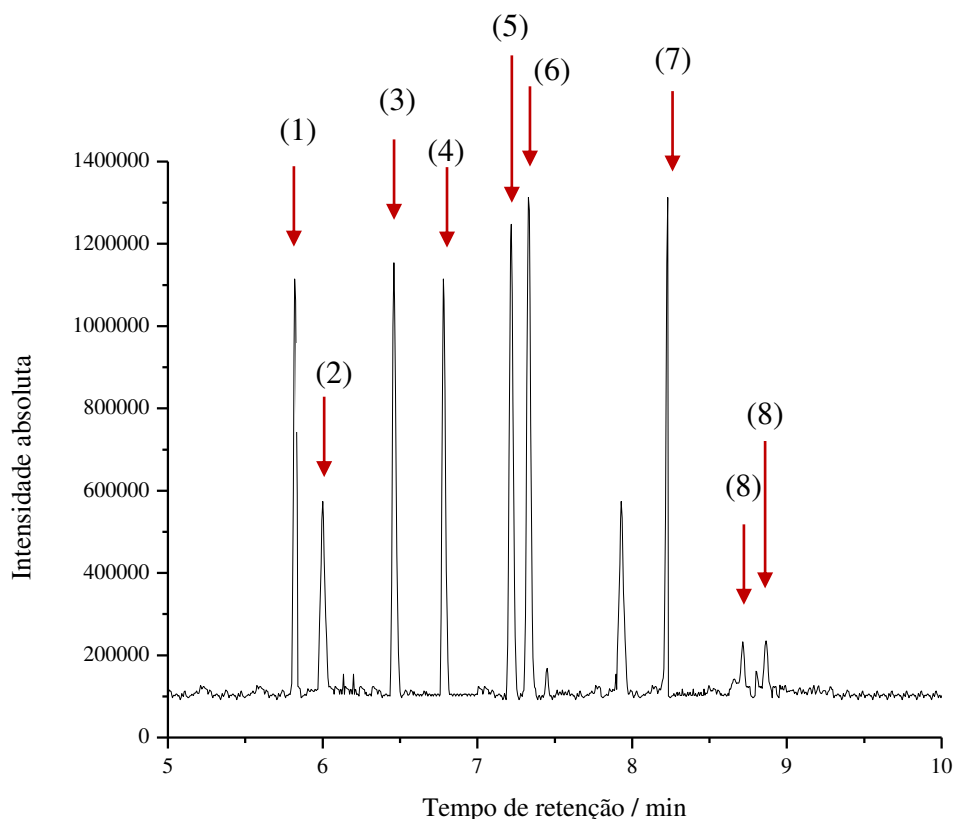
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise cromatográfica

O cromatograma de uma solução padrão contendo todos os analitos em estudo (pirimifós-metílico, clorpirifós, triadimenol, flutriafol, dieldrin, ciproconazol, bifentrina, λ -cialotrina) preparada em acetonitrila na concentração de 3 mg L⁻¹ foi obtido utilizando as condições cromatográficas descritas no item 3.3 em um GC-MS. O cromatograma obtido no

modo SCAN é apresentado na Figura 1. Com o auxílio da biblioteca NIST 2014 e o uso de solução padrão foi possível identificar cada um dos pesticidas.

Figura 1. Cromatograma de uma solução padrão dos pesticidas em acetonitrila no modo *Scan* na concentração de 3 mg L^{-1} para todos os analitos. Os tempos de retenção obtidos foram: (1) pirimifós-metílico ($t_R = 5,82 \text{ min}$), (2) clorpirifós ($t_R = 6,00 \text{ min}$), (3) triadimenol ($t_R = 6,46 \text{ min}$), (4) flutriafol ($t_R = 6,78 \text{ min}$), (5) dieldrin ($t_R = 7,22 \text{ min}$), (6) ciproconazol ($t_R = 7,33 \text{ min}$), (7) bifentrina ($t_R = 8,22 \text{ min}$) e (8) λ -cialotrina ($t_R = 8,71; 8,87 \text{ min}$).



Pelo cromatograma apresentado é possível observar que as condições cromatográficas estabelecidas forneceram uma boa resolução dos picos. A análise foi realizada no GC-MS pelo modo *Scan* ou *TIC* (*total ion chromatogram* - cromatograma de íons totais), para identificar os pesticidas, determinar o tempo de retenção e os espectros de massa de cada um dos pesticidas.

A quantificação do método foi realizada no modo *SIM* (*Select Ion Monitoring*), considerando os três íons (m/z) selecionados para cada analito sendo, um íon alvo e dois de referência. Na Tabela 3 são apresentados os tempos de retenção e os íons (m/z) selecionados para cada pesticidas.

Tabela 3. Pesticidas em estudo, seus respectivos tempos de retenção e íon (m/z) selecionados para quantificação.

Pesticidas	Tempo de retenção (min)	Íons monitorados (m/z)
Pirimifos-metílico	5,82	290, 276, 305
Clorpirifós	6,00	199, 197, 314
Triadimenol	6,46	112, 168, 128
Flutriafol	6,78	123, 164, 219
Dieldrin	7,22	79, 81, 82
Ciproconazol	7,33	222, 139, 125
Bifentrina	8,22	181, 166, 165
λ -cialotrina	8,71; 8,87	181, 197, 208

4.2. Otimização do método LLE/LTP-MS para determinação de resíduos de pesticidas em infusão de chá

A otimização do método foi dividida em duas etapas. Na primeira, os parâmetros da extração volume de amostras, volume de solvente extrator e força iônica foram otimizados. Posteriormente, foram otimizados os parâmetros tempo de agitação e tempo de congelamento.

4.2.1. Otimização dos parâmetros volume de amostra, volume de solvente extrator e força iônica

No primeiro planejamento foram estudados três parâmetros, volume de amostra, volume de acetonitrila e força iônica, conforme descrito no item 3.6.3. A otimização destes fatores foi realizada através do planejamento fatorial completo 2^3 , com ponto central (n=3). A significância de cada fator foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), usando níveis de significância p-valor. As áreas de cada pesticidas no extrato de cada ensaio foram determinadas experimentalmente, e utilizadas como resposta para gerar os gráficos de pareto. Estes gráficos (Figura 2 e Figura 3) mostram os valores dos efeitos de cada uma das variáveis, possibilitando verificar se os mesmos são estatisticamente significativos.

Figura 2. Gráficos de Pareto dos efeitos das variáveis (1) força iônica, (2) volume de amostra e (3) volume de ACN para os pesticidas (A) pirimifós-metílico, (B) clorpirifós, (C) triadimenol, (D) flutriafol.

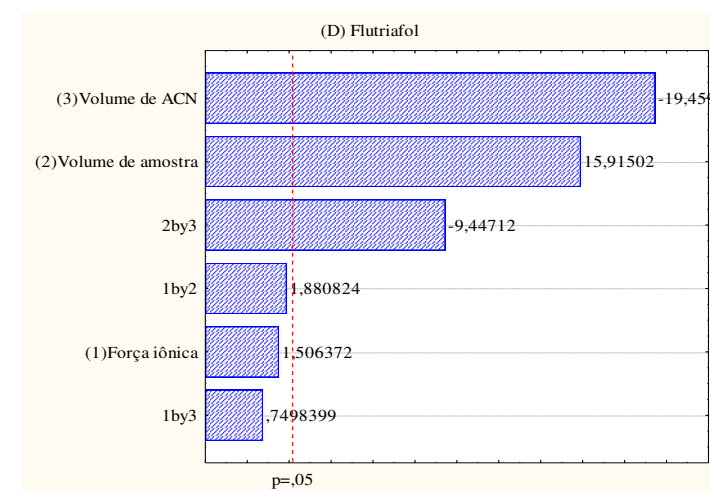
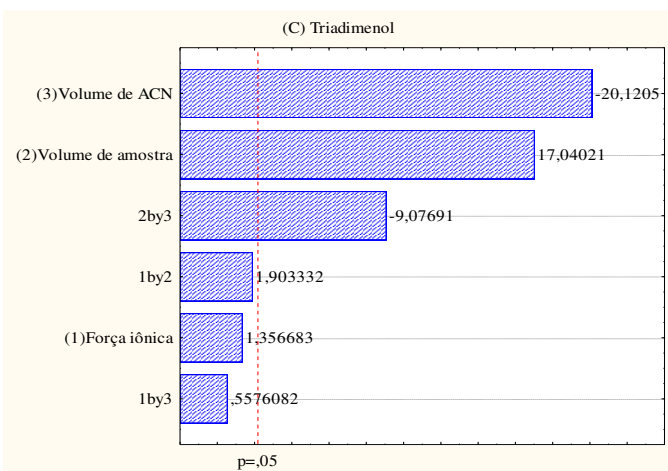
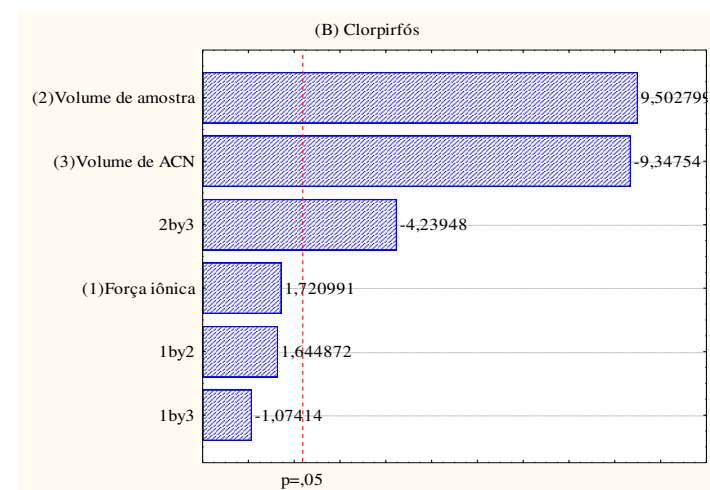
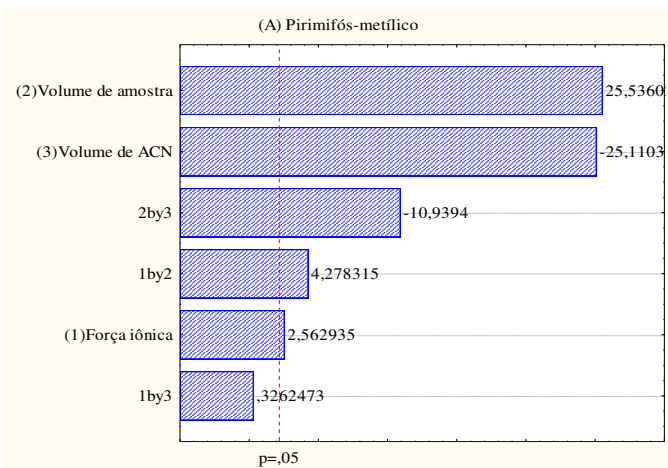
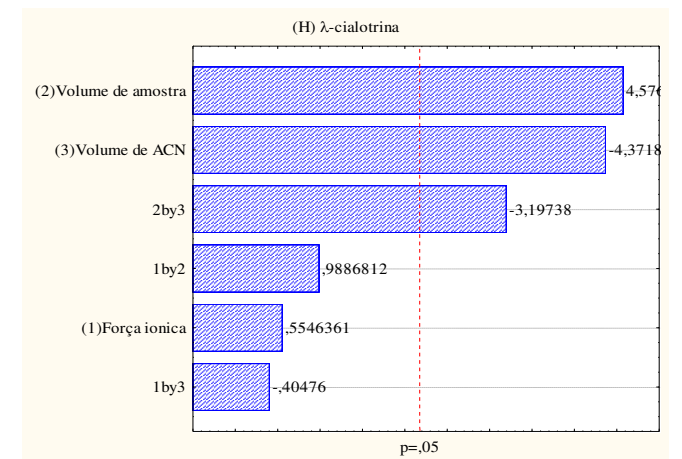
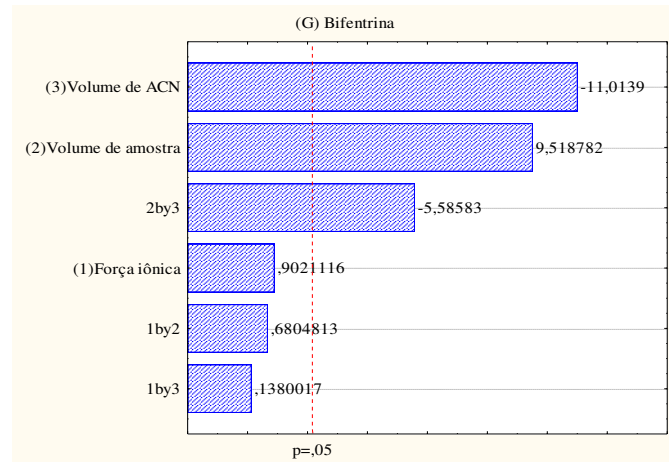
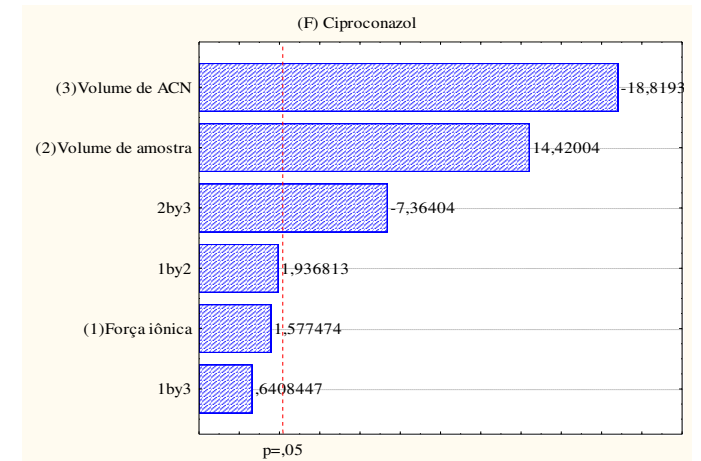
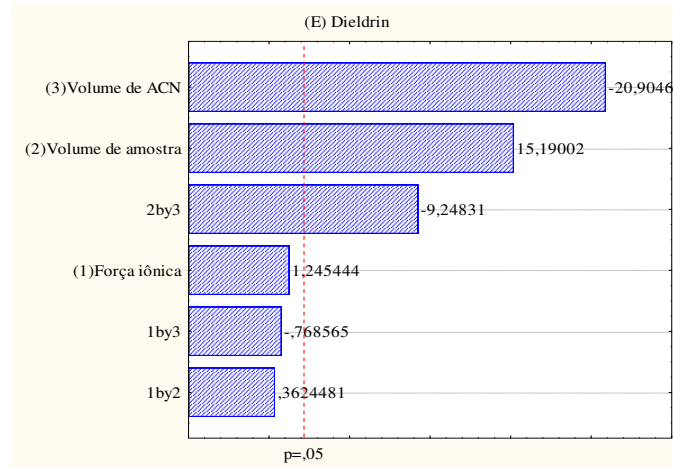


Figura 3. Gráficos de Pareto dos efeitos das variáveis (1) força iônica, (2) volume de amostra e (3) volume de acetonitrila para os pesticidas (E) dieldrin, (F) ciproconazol, (G) bifentrina, (H) λ -cialotrina.



A Tabela 4 apresenta um resumo dos dados com todos os pesticidas e os valores dos efeitos de cada uma das variáveis e da interação entre elas para a otimização da força iônica, volume de amostra e volume de acetonitrila em LLE/LTP em chá pronto (infusão).

Tabela 4. Valores dos efeitos de cada uma das variáveis e da interação entre elas para a otimização da força iônica, volume de amostra e volume de acetonitrila em LLE/LTP em chá pronto.

Analitos	(1) Força iônica	(2) Amostra	(3) ACN	1x2	1x3	2x3
Pirimifos-metílico	2,56	25,5	-25,1	4,28	NS	-10,9
Clorpirifós	NS	9,50	-9,35	NS	NS	-4,24
Triadimenol	NS	17,0	-20,1	NS	NS	-9,08
Flutriafol	NS	15,9	-19,4	NS	NS	-9,45
Dieldrin	NS	15,2	-20,9	NS	NS	-9,25
Ciproconazol	NS	14,4	-18,8	NS	NS	-7,36
Bifentrina	NS	9,58	-11,0	NS	NS	-5,58
λ -Cialotrina	NS	4,57	-4,37	NS	NS	-3,20

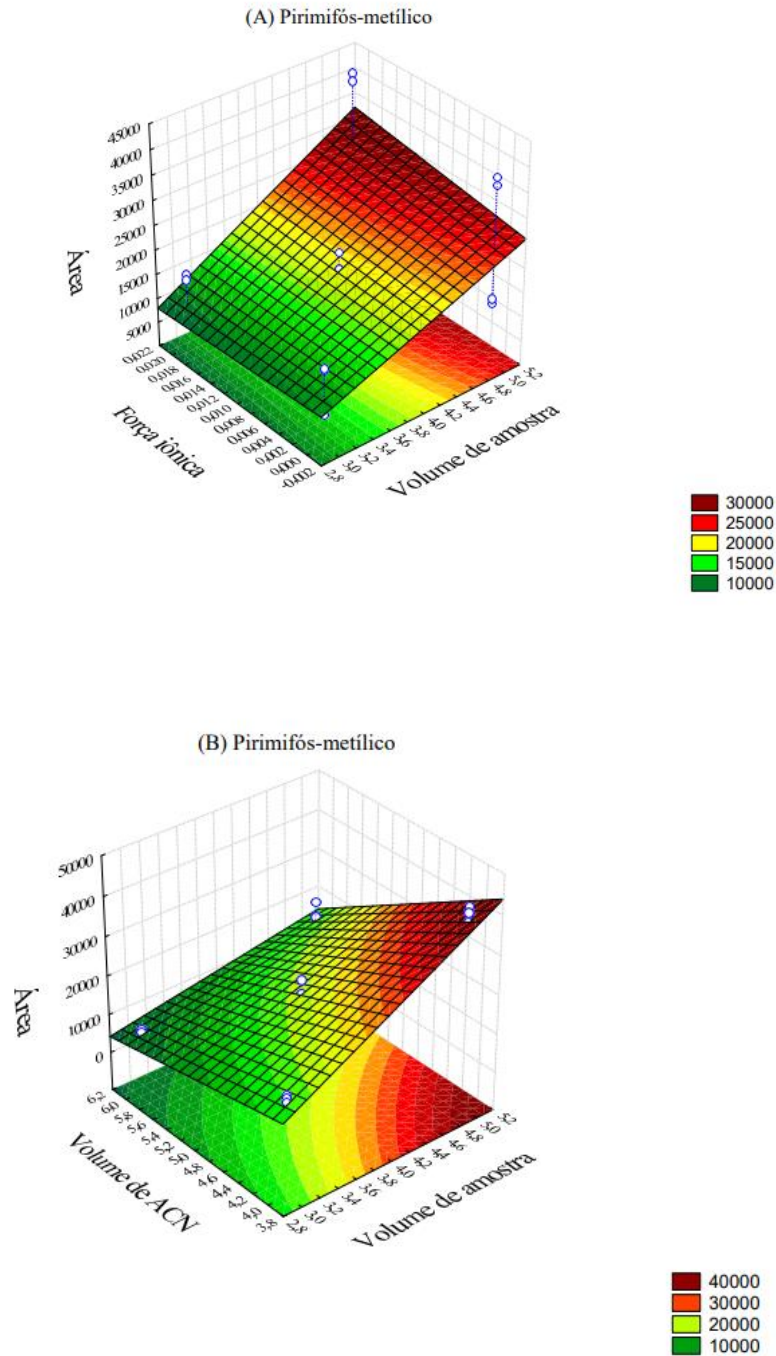
ACN = acetonitrila; NS = não significativo.

A partir dos gráficos de Pareto, pode-se observar que a força iônica (Fator 1), afeta positivamente a extração do pirimifós-metílico, mas não foi estatisticamente significativa para os demais analitos. Observa-se também que o volume de amostra (Fator 2) foi significativo positivo para todos os pesticidas. Já o volume de acetonitrila (Fator 3) foi significativo negativo para todos os compostos.

Analisando as interações entre os parâmetros força iônica (1) e volume de amostra (2) pode-se perceber que este foi significativo positivo apenas para o composto pirimifós-metílico, o que pode ser observado na superfície de resposta apresentada na Figura 4. Portanto, optou-se neste estudo por não alterar a força iônica, uma vez que para os demais compostos este parâmetro apresentou uma resposta não significativa, além disso, o composto pirimifós-metílico apresenta boa resposta cromatográfica, o que reforça esta decisão. Isto também permitirá simplificar o preparo de amostra. Já as interações entre volume de amostra (2) e volume de acetonitrila (3) foram significativos negativos para todos os compostos, indicando que para uma melhor extração deve-se utilizar maior volume de amostra e menor volume de acetonitrila. Para melhor visualizar este efeito, foi construído um gráfico de

superfície de resposta (Figura 4) para um dos compostos em estudo (pirimifós-metílico), pois todos apresentam a mesma tendência, em relação a superfície de resposta envolvendo volume de acetonitrila e volume de amostra.

Figura 4. Superfície de resposta envolvendo os fatores força iônica, volume da amostra e volume de acetonitrila para o analito pirimifós-metílico.



Esses resultados mostram que as condições ótimas que favorecerão a extração LLE/LTP em amostras de chá pronto (infusão) são, o maior volume de amostra (5,00 mL) e o menor volume de acetonitrila (4,00 mL) para os pesticidas pirimifós-metílico, clorpirifós, triadimenol, flutriafol, dieldrin, ciproconazol, bifentrina e λ -cialotrina.

4.2.2. Otimização do tempo de agitação e congelamento

Um segundo planejamento foi realizado com o objetivo de otimizar outros parâmetros importantes para obter uma melhor extração pela técnica LLE/LTP que são, o tempo de agitação e o tempo de congelamento. A agitação afeta a dessorção, enquanto o tempo de congelamento influencia a distribuição dos analitos na fase orgânica. À medida que a amostra congela, a água é gradualmente transferida da fase líquida para a fase sólida, o que resulta em um aumento na concentração dos analitos na fase orgânica. O desenho experimental visou identificar as condições que proporcionam os melhores resultados: um tempo de agitação que maximize a dessorção dos analitos da infusão para a solução extrativa e um tempo de congelamento que favoreça a distribuição ótima dos analitos na fase orgânica.

A otimização destes fatores foi realizada empregando o planejamento fatorial 2^2 , com ponto central ($n=3$). A significância de cada fator foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), usando níveis de significância p-valor. Sendo determinadas experimentalmente as áreas de cada analito no extrato de cada ensaio, as quais foram utilizadas como respostas para gerar os gráficos de Pareto dos efeitos.

Os gráficos de Pareto obtidos são mostrados na Figura 5 e 6.

Figura 5. Gráficos de Pareto dos efeitos das variáveis (1) agitação e (2) congelamento para os pesticidas (A) pirimifós-metílico, (B) clorpirifós, (C) triadimenol, (D) flutriafol.

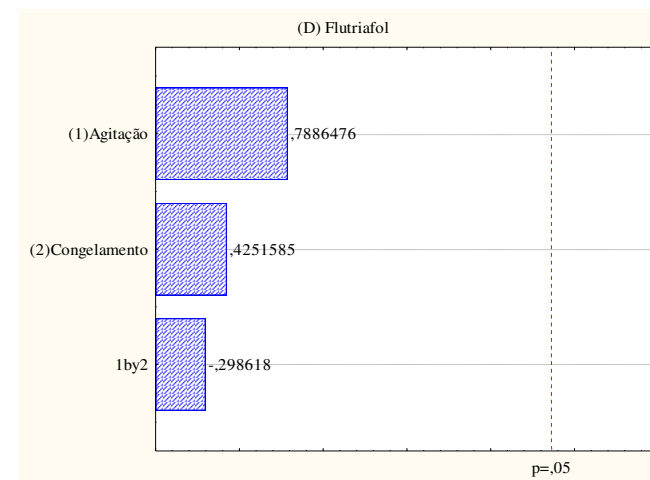
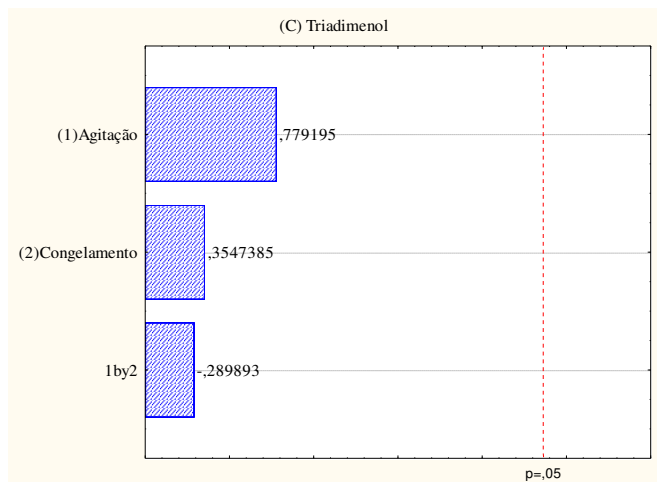
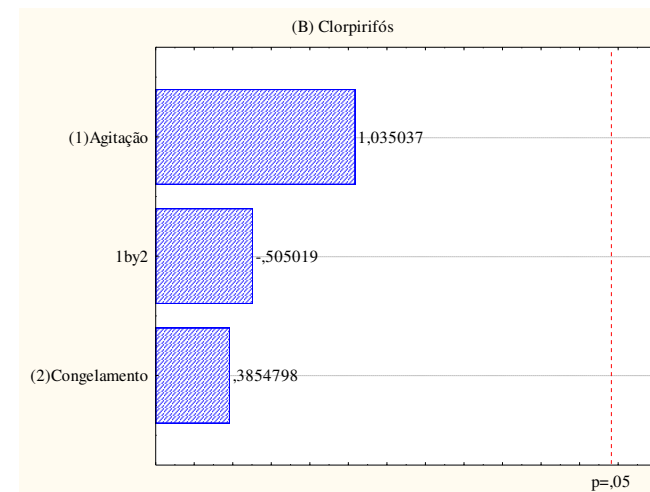
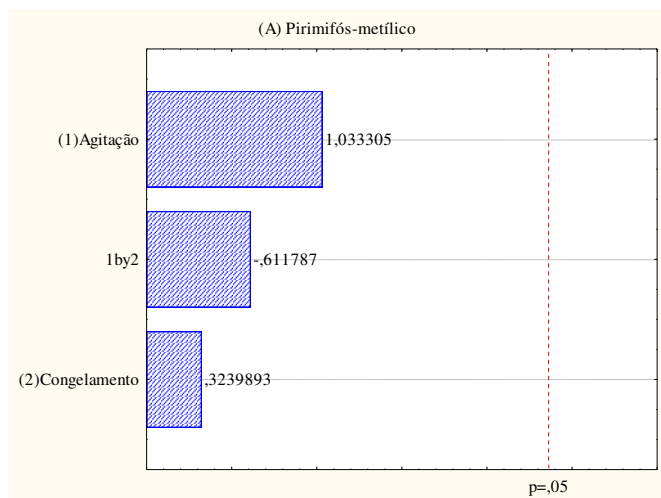
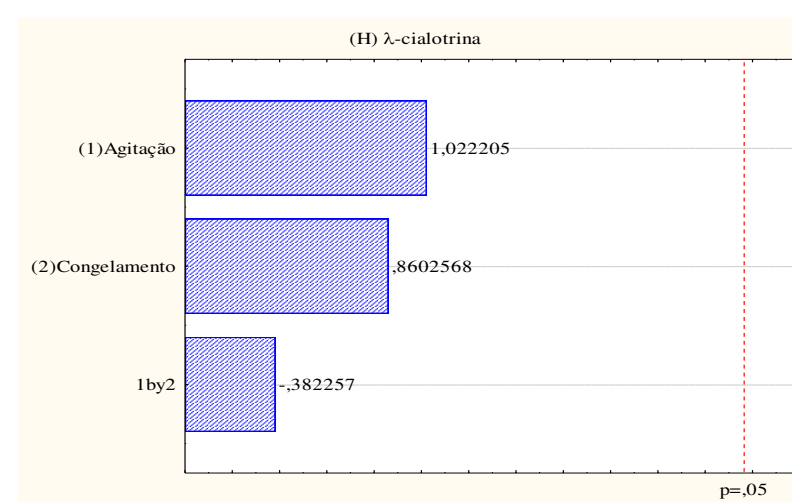
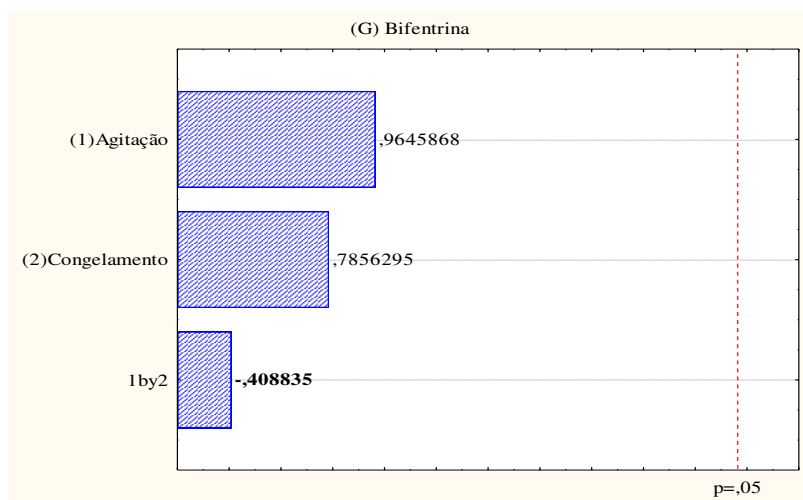
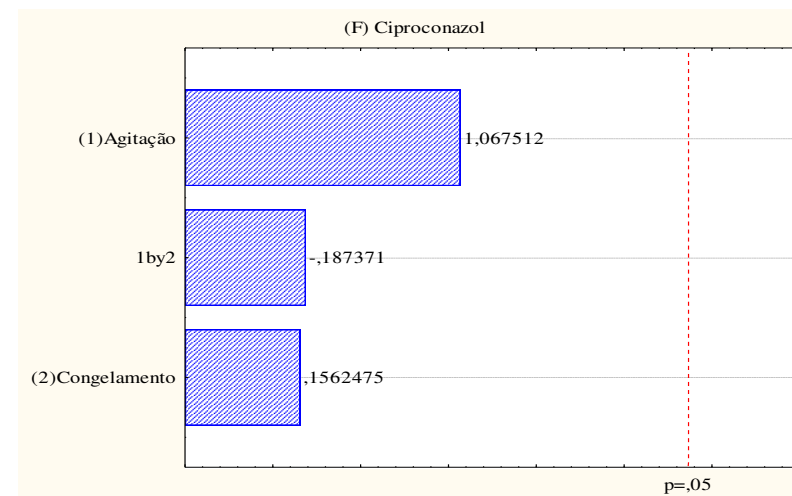
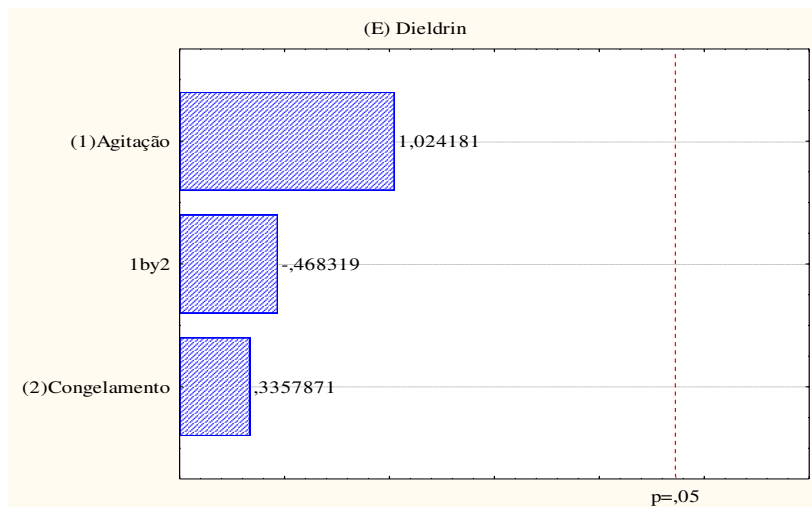


Figura 6. Gráficos de Pareto dos efeitos das variáveis (1) agitação e (2) congelamento para os pesticidas (E) dieldrin, (F) ciproconazol, (G) bifentrina, (H) λ -cialotrina.



Pelos resultados obtidos é possível verificar que os fatores tempo de agitação (fator 1) e tempo de congelamento (fator 2) avaliados a 95% de significância ($p < 0,5$), não foram significativos para a extração destes pesticidas pela técnica LLE/LTP. Em função destes resultados foi escolhido para este estudo o menor tempo de agitação e de congelamento.

Assim, menor tempo de agitação, 30 s, e menor tempo de congelamento, 4 h, devem ser empregados para a determinação desses pesticidas em amostras de infusão de chá verde empregando o método LLE/LTP-GC-MS.

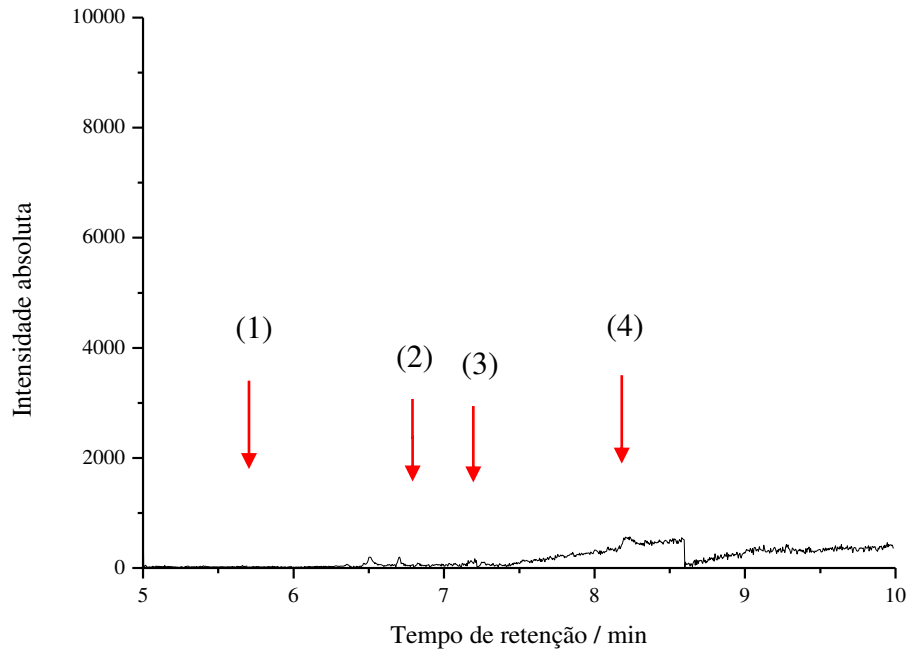
Em resumo, o método SLE/LTP otimizado consiste em se adicionar 4,00 mL de acetonitrila juntamente com 5,00 mL de amostra. A mistura resultante deve ser agitada por 30 segundos e posteriormente armazenada em um freezer a cerca de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 horas. Após o congelamento, o extrato sobrenadante deve ser cuidadosamente separado e analisado utilizando GC-MS. A versão otimizada da técnica SLE/LTP necessita de quantidades reduzidas tanto de amostra quanto de solvente extrator. Além disso, elimina a necessidade de etapas adicionais como limpeza, evaporação e troca de solvente, o que diminui o risco de contaminação e minimiza o desperdício de amostras.

4.3. Validação do método LLE/LTP

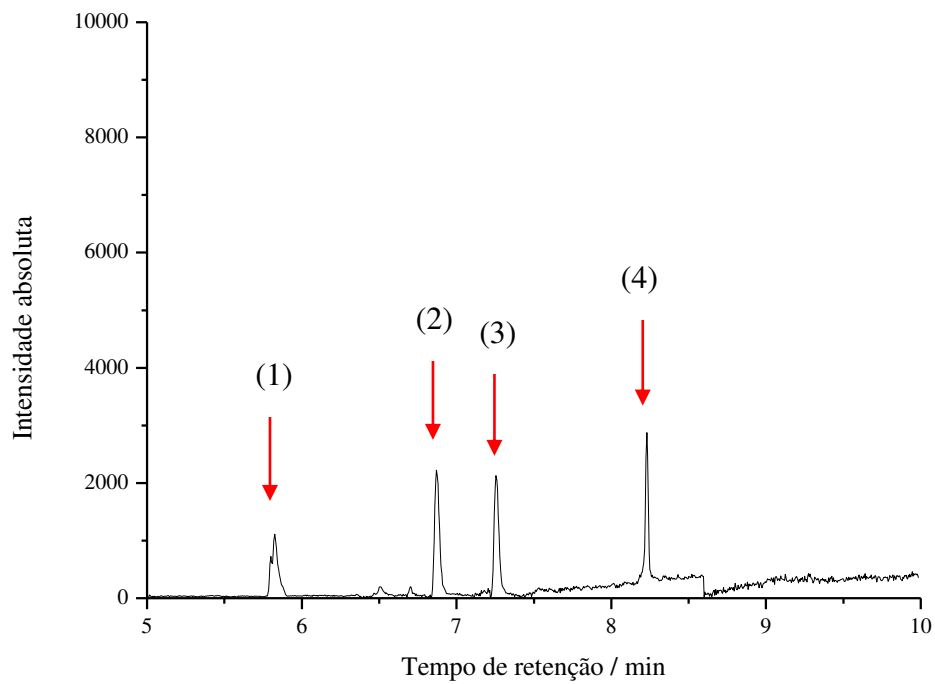
Para avaliar a seletividade, o método (LLE/LTP-GC-MS) otimizado foi aplicado em amostras de infusão preparadas a partir de folhas de chá verde isentas dos pesticidas em estudo. Posteriormente, essas infusões foram fortificadas com os analitos (pirimifos-metilico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina) e submetidas novamente ao método de extração e em seguida os extratos foram analisados por GC-MS. Os cromatogramas obtidos foram comparados e não foi observado nenhum interferente no tempo de retenção dos analitos avaliados (Figura 7).

Figura 7. Cromatogramas, obtidos pelo GC-MS, do extrato de infusões de de folhas de chá verde: A) isentas dos analitos; (B) contendo os pesticidas, (1) pirimifós-metílico ($t_R = 5,82$ min), (2) flutriafol ($t_R = 6,78$ min), (3) ciproconazol ($t_R 7,33$ min) e (4) bifentrina ($t_R = 8,22$ min).

A)



B)

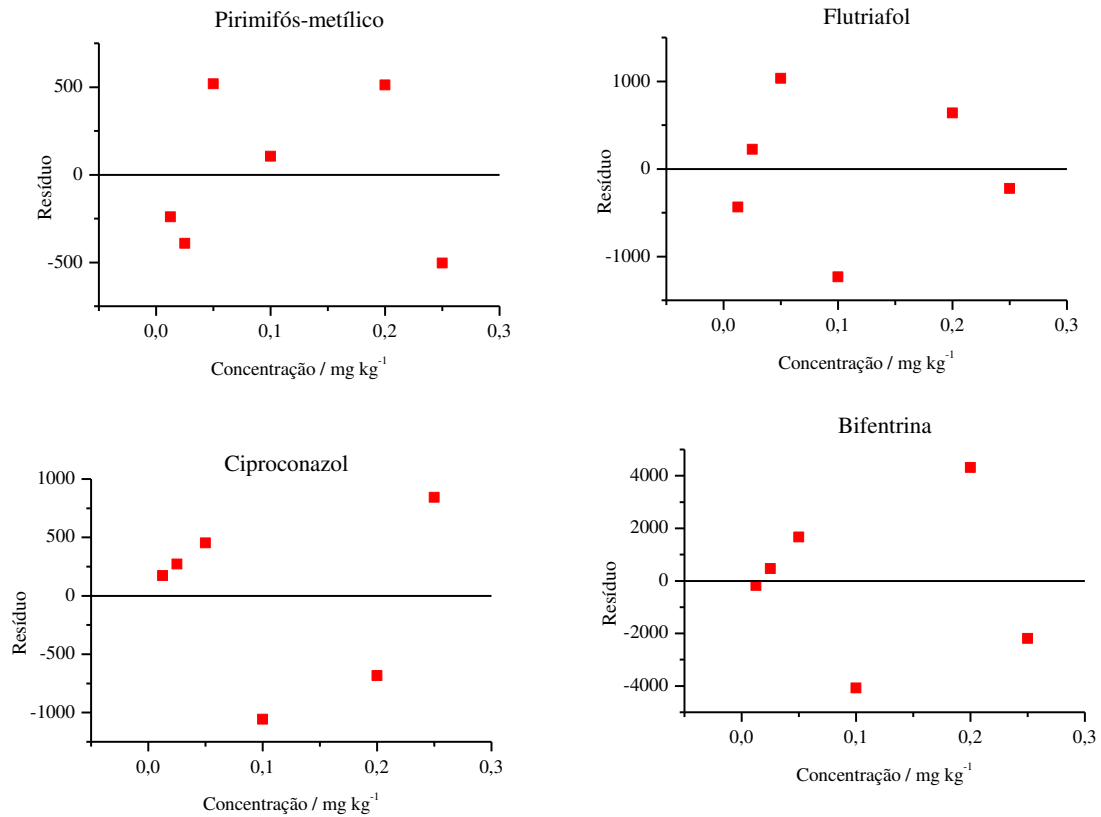


Ao analisar o cromatograma do extrato isento dos analitos (branco), é possível observar a ausência de picos no mesmo tempo de retenção dos analitos em estudo, demonstrando assim a seletividade do método.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método, determinados pela relação sinal-ruído foram 0,004 e 0,0125 mg L⁻¹ respectivamente para todos os pesticidas.

Para avaliar a linearidade de resposta do método otimizado, o mesmo foi aplicado em amostras de infusão de chá verde fortificadas em 5 concentrações e em triplicata. Foi construída uma curva analítica nas concentrações 0,0125; 0,025; 0,10; 0,20; 0,25 mg L⁻¹ para cada um dos analitos e a linearidade foi avaliada pelo método dos mínimos quadrados. Os coeficientes de determinação (R^2) e as equações das curvas analíticas de cada um dos pesticidas são apresentados na Tabela 5. Esses dados mostram que as curvas analíticas obtidas pelo método de superposição de matriz, apresentam valores de R^2 maiores que 0,990, confirmando a sua linearidade conforme as recomendações da ANVISA, 2017. Também foram avaliados os gráficos de resíduos obtidos a partir de valores calculados pela curva analítica de cada pesticidas. Pelos gráficos de resíduos apresentados na Figura 8 observa-se que os pontos não seguem um padrão de distribuição, podendo-se dizer então que a variância é constante e que a relação é linear, indicando assim que o modelo de regressão se ajustou adequadamente aos dados.

Figura 8. Gráficos de resíduos dos pesticidas pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina para as curvas analíticas em amostras de infusão de folha de chá verde.



As porcentagens de recuperação variaram de 86,0 – 102% (Tabela 5). Esses resultados estão dentro da faixa aceitável pela ANVISA (2017), que é de 70-120%, demonstrando que o método otimizado apresenta boa exatidão.

A precisão, em termos de repetitividade, foi avaliada empregando o método para determinação dos pesticidas, em amostras de infusão fortificadas, em três níveis de concentração (0,0125; 0,1 e 0,25 mg L⁻¹) e em triplicata. As análises foram realizadas no mesmo dia, nas mesmas condições pelo mesmo operador. Os coeficientes de variação ficaram entre 0,13% e 8,07% (Tabela 5), mostrando uma boa repetitividade do método, uma vez que estes estão abaixo dos valores recomendados pela ANVISA (2017), que é de 20%.

A precisão intermediária foi avaliada por meio dos coeficientes de variação (CV), obtidos pela aplicação do método, em três dias não consecutivos pelo mesmo analista, no mesmo laboratório, nas mesmas condições de trabalho, em amostras de infusão chá fortificadas em três níveis de concentração e em triplicata. Os níveis de fortificação avaliados foram 0,0125; 0,10 e 0,25 mg L⁻¹. Os valores de CV obtidos variaram de 4,72% a 17,8%,

como mostrado na Tabela 5. Os resultados obtidos mostram uma boa precisão intermediária, pois são aceitáveis coeficientes de variação de até 20% segundo ANVISA, 2017.

Tabela 5. Parâmetros de validação do método ELL/LTP-GC-MS para determinação de pesticidas em amostras de infusão de folhas de chá verde: regressão linear ($y = \text{área}$, $x = \text{concentração em mg L}^{-1}$), coeficiente de determinação (R^2) faixa linear; nível de fortificação (NF); Porcentagem de recuperação e desvio padrão ($\% R \pm DP$), precisão inter e intra-dia, e coeficiente de variação (CV).

Composto	Regressão linear / R^2	Faixa linear	mg L ⁻¹			$R \pm DP$ (%)	Intra- dia	Inter- dia
			LOD/LOQ	NF	CV (%) n = 3		CV (%) n = 9	
Pirimifós- metílico	$y = 107524x + 1249$ 0,998	0,0125 - 0,25	0,004/0,0125	0,0125	86,1 ± 0,0002	8,07	8,77	
					0,1	101 ± 0,008	4,84	4,96
					0,25	98,9 ± 0,021	6,27	5,97
Flutriafol	$y = 238420x + 1582,1$ 0,998	0,0125 - 0,25	0,004/0,0125	0,0125	86,3 ± 0,0001	2,30	14,7	
					0,1	95,8 ± 0,002	0,81	6,01
					0,25	101 ± 0,023	3,93	5,32
Ciproconazol	$y = 134547x + 554,03$ 0,997	0,0125 - 0,25	0,004/0,0125	0,0125	102 ± 0,001	0,13	10,9	
					0,1	86,0 ± 0,001	1,06	4,72
					0,25	95,7 ± 0,007	0,95	11,5
Bifentrina	$y = 616445x + 1839,5$ 0,997	0,0125 - 0,25	0,004/0,0125	0,0125	97,5 ± 0,0002	3,93	17,8	
					0,1	93,1 ± 0,005	1,29	5,43
					0,25	98,3 ± 0,019	1,51	7,07

Para desenvolver um método analítico é fundamental avaliar os possíveis efeitos de matriz (EM) na análise cromatográfica. Com esse propósito, foram preparadas duas curvas analíticas, uma em solvente puro (acetonitrila) e outra em extratos de amostras de infusão das folhas de chá verde (obtidos após a submissão das amostras à técnica de extração – LLE/LTP). A avaliação do efeito de matriz foi realizada por meio da comparação das inclinações das curvas analíticas obtidas nos extratos e no solvente. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Efeito de matriz (%EM) na resposta cromatográfica dos pesticidas presentes no extrato de infusão de chá obtido pelo método LLE/LTP-GC-MS.

Pesticidas	%ME
Pirimifós-metílico	-0,83
Flutriafol	0,81
Ciproconazol	0,74
Bifentrina	2,5

O efeito de matriz pode ser positivo com um aumento no sinal do detector ou negativo com uma diminuição no sinal (supressão). Como pode ser observado na Tabela 6, o efeito de matriz obtido na extração dos pesticidas em amostra de infusão preparada a partir das folhas de chá verde por LLE/LTP variou de -0,83 a 2,5 %. A presença de coextrativos pode causar variações na resposta cromatográfica durante a análise. Segundo, Pinho *et al.*, (2010) quanto maior a complexidade da matriz maior será o efeito de matriz. Pela Tabela 6 pode-se observar que o efeito de matriz foi positivo para o flutriafol, ciproconazol e bifentrina. Isso pode ser explicado pelo fato dos coextrativos competirem com os analitos por sítios ativos do injetor, com isso, uma maior quantidade de analito é transferido para a coluna cromatográfica e, conseqüentemente chegam ao detector levando ao aumento do sinal (SOUSA *et al.*, 2012). Já o pirimifós-metílico apresentou efeito de matriz negativo. Isso ocorre quando componentes não voláteis da matriz se acumulam no insert/liner ou na coluna cromatográfica, criando novos sítios ativos. Esses sítios podem ligar os analitos, diminuindo a quantidade que chega à coluna cromatográfica e, conseqüentemente, ao detector. Como resultado, a resposta cromatográfica é reduzida em comparação com amostras preparadas em solvente puro. Valores de EM entre 0-20% é considerado efeito de matriz baixo, enquanto EM é considerado moderado com valores entre 20 e 50%, maiores que esse valor é considerado um EM elevado (SHENDY *et al.*, 2019). Para reduzir essa influência na quantificação dos pesticidas, uma abordagem recomendada é a utilização de curvas analíticas preparadas no extrato da matriz.

4.4. Aplicação do método LLE/LTP-GC-MS em amostras comerciais

O método LLE/LTP-GC-MS otimizado e validado neste estudo foi testado para controle de qualidade de infusões preparadas a partir de seis amostras de folhas de chá verde adquiridas no mercado local de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Não foram detectados resíduos dos pesticidas investigados nessas amostras.

4.5. Estudo da transferência dos pesticidas das folhas de chá verde para as infusões

Os resultados da transferência de resíduos de pesticidas das folhas de chá verde para a infusão, preparada em diferentes temperaturas (80 e 100 °C) e tempos de infusão (5, 15, 30 e 60 min), foram determinados através das porcentagens de transferência de acordo com a Equação 2 como descrito no item 3.10. Os dados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Porcentagem de transferência de resíduos de pesticidas para a infusão de chá verde em diferentes temperaturas de preparo e tempo de infusão.

Pesticidas	Concentração folha (mg kg ⁻¹)	Tempo (min)	80 °C		100 °C	
			Concentração infusão mg L ⁻¹	% Transferência	Concentração infusão mg L ⁻¹	% Transferência
Pirimifós-metílico	12	5	0,0137	11,4	0,0296	24,7
		15	0,0141	11,8	0,0286	23,9
		30	0,0139	11,5	0,0276	23,0
		60	0,0146	12,1	0,0271	22,6
Ciproconazol	70	5	0,329	47,0	0,454	64,9
		15	0,362	51,7	0,450	64,3
		30	0,365	52,2	0,471	67,3
		60	0,360	51,4	0,445	63,6
Bifentrina	40	5	n.d	n.d	0,0152	3,81
		15	n.d	n.d	0,0149	3,73
		30	n.d	n.d	0,0155	3,88
		60	n.d	n.d	0,0150	3,75

Conforme apresentado na Tabela 7, tanto nas temperaturas de infusão de 100 °C e 80 °C a translocação do ciproconazol para a infusão foi mais significativa, com taxas entre 63,6% - 67,3% e 47,0% - 52,2%, respectivamente. Em seguida o pirimifós-metílico apresentou uma transferência de 22,6% - 24,7% para temperatura de 100 °C e 11,4% - 12,1% para temperatura de 80 °C. Por outro lado, a bifentrina apresentou a menor taxa de transferência, uma porcentagem variando entre 3,73% - 3,88% para temperatura de infusão de 100 °C, enquanto para a temperatura de 80 °C os resultados ficaram abaixo do limite de quantificação (LQ).

Esses resultados sugerem que o ciproconazol com um coeficiente de partição octanol-água mais baixo ($\log K_{ow} = 3,08$) e maior solubilidade em água (93 mg L^{-1}), apresentou uma transferência mais elevada em comparação com os demais pesticidas. O pirimifós-metílico ($\log K_{ow} = 4,19$) e solubilidade de 11 mg L^{-1} , apresentou uma taxa intermediária, enquanto a bifentrina, com um valor de $\log K_{ow}$ mais alto ($\log K_{ow} = 6,56$) e a menor solubilidade em comparação aos demais ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$) exibiu uma transferência baixa para a infusão, o que é consistente com outros estudos que relataram baixa ou nenhuma detecção de resíduos deste pesticidas na bebida de chá (TEWARI *et al.*, 2005, CHO *et al.*, 2014).

A taxa de transferência de resíduos de pesticidas para a infusão depende principalmente da sua solubilidade em água (CHO *et al.*, 2014; GUPTA & SHANKER, 2009; WAN, XIA & CHEN, 1991). Um segundo fator significativo é o coeficiente de partição octanol-água de cada analito. Quanto maior a solubilidade em água, maior será sua transferência para a infusão. Por outro lado, em relação ao coeficiente de partição octanol-água, observa-se que quanto menor esse coeficiente, maior é a taxa de transferência (XIAO *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2019; JIANG *et al.*, 2020).

Valores de $\log K_{ow}$ mais elevados tendem a apresentar uma baixa transferência para a infusão. Isso ocorre porque os pesticidas penetram nos tecidos, vinculando-se fortemente com eles e não se movem para a água (NAGAYAMA, 1996). Esse fenômeno confirma os resultados obtidos neste estudo.

Para verificar se o tempo de preparo do chá influencia na transferência dos pesticidas, os dados obtidos para cada uma das temperaturas de infusão (80 °C e 100 °C) foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA). O objetivo foi determinar se há diferença significativa entre as médias dos tratamentos. Adotou-se um nível de significância de $\alpha = 5\%$. Valores de $p (> 0,05)$ indicam que a hipótese nula é aceita sugerindo que as médias dos tratamentos são iguais. Por outro lado, valores de $p (< 0,05)$ levam a rejeição da hipótese nula

e aceita a hipótese alternativa, indicando que pelo menos um dos grupos possui médias diferentes.

Após analisar a variação dos dados obtidos ao variar o tempo de infusão tanto para as temperaturas de 80 °C quanto de 100 °C, adotando um nível de significância de 5% foi obtido um valor de $p > 0,05$. Portanto, conclui-se que o aumento no tempo de preparo não teve um efeito significativo na transferência de nenhum dos pesticidas estudados (pirimifós-metílico; ciproconazol e bifentrina) para a infusão, ou seja, 5 min já é suficiente para que ocorra a transferência dos pesticidas para o chá.

A análise de Variância (ANOVA) também foi utilizada para verificar se existe diferença significativa entre as médias dos tratamentos nas temperaturas de 80 °C e 100 °C. Foi adotado um nível de significância de $\alpha = 5\%$. Após a análise foi obtido um valor de $p < 0,05$. Conclui-se que o aumento da temperatura teve um efeito significativo na transferência dos pesticidas das folhas de chá verde para a infusão. Na Tabela 7 é possível observar que o aumento da temperatura levou a um aumento na taxa de transferência de todos os analitos em estudo. Na temperatura de 100 °C a porcentagem de transferência foi maior quando comparada com as porcentagens de transferência em 80 °C. Outros estudos também relataram o aumento da porcentagem de transferência de pesticidas com o aumento da temperatura (CHEN *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2018). Isso provavelmente ocorre porque o aumento da temperatura acelerou a dissolução de pesticidas, facilitando sua liberação de matrizes secas de chá para a solução (infusão) de chá (ZHOU *et al.*, 2018; JIANG *et al.*, 2020)

Dessa forma, o aumento do tempo de preparo não altera a transferência dos pesticidas pirimifós-metílico, ciproconazol e bifentrina para a infusão de chá verde, porém, o superaquecimento da água para a preparação do chá não é aconselhado, uma vez que a temperatura mais alta pode aumentar a transferência para a infusão.

5. CONCLUSÃO

A técnica LLE/LTP foi otimizada e validada para determinação de diferentes pesticidas em infusões, preparadas a partir de folhas de chá verde desidratadas, por GC-MS. O método é viável, apresentando um LQ de 0,0125 mg L⁻¹, uma porcentagem de recuperação de 86,0 - 102% e CV menor que 17,8.

Este estudo revelou que as condições de infusão podem influenciar as porcentagens de transferência dos pesticidas (pirimifós-metílico, ciproconazol e bifentrina) das folhas de chá verde para a infusão. A transferência dos pesticidas para a infusão aumentou com o aumento da temperatura da água, enquanto a duração da infusão não influenciou na transferência, se

mantendo constante. Resíduo do ciproconazol, apresentou maior taxa de transferência, devido esse pesticida apresentar menor log Kow e maior solubilidade em água quando comparado com os demais. A bifentrina apresentou menor taxa de transferência, uma vez que essa apresenta maior valor de log Kow e menor solubilidade em água.

6. REFERÊNCIAS

- ANVISA. RDC N. 166, de 25 de Julho de 2017. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, v. 2017, p. 1–21, 2017.
- CHEN, H., PAN, M., LIU, X., & LU, C. Evaluation of transfer rates of multiple pesticides from green tea into infusion using water as pressurized liquid extraction solvent and ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food chemistry**, v. 216, p.1-9, 2017.
- CHO, S. K., ABD EL-ATY, A. M., RAHMAN, M. M., CHOI, J. H., SHIM, J. H. Simultaneous multi-determination and transfer of eight pesticide residues from green tea leaves to infusion using gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 165, p. 532-539, 2014.
- DE PINHO, G. P., NEVES, A. A., DE QUEIROZ, M. E. L. R., & SILVÉRIO, F. O. Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food control**, v. 21, p. 1307-1311, 2010.
- DE SOUSA, F. A., COSTA, A. I. G., DE QUEIROZ, M. E. L. R., TEÓFILO, R. F., NEVES, A. A., DE PINHO, G. P. Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA. **Food Chemistry**, v.135, n.1, p. 179-185, 2012.
- FANG, L., Long, N., Li, Y., Liao, X., Shi, L., Zhao, H., LIDONG, Z., & Kong, W. Transfer behavior of pesticides from honeysuckle into tea infusions: Establishment of an empirical model for transfer rate prediction. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 234, p.113377, 2022.
- GOULART, S. M., DE QUEIROZ, M. E. L., NEVES, A. A., & DE QUEIROZ, J. H. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, p. 1320-1323, 2008.
- GUPTA, M., SHANKER, A. Fate of imidacloprid and acetamiprid residues during black tea manufacture and transfer into tea infusion. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, n. 2, p. 157-163, 2009.

GURUSUBRAMANIAN, G., RAHMAN, A., SARMAH, M., RAY, S., & BORA, S. Pesticide usage pattern in tea ecosystem, their retrospects and alternative measures. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, p. 813-826, 2008.

JIANG, M., ZHANG, W., ZHANG, T., LIANG, G., HU, B., HAN, P., & GONG, W. Assessing transfer of pesticide residues from chrysanthemum flowers into tea solution and associated health risks. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 187, p. 109859, 2020.

JIANG, M., ZHANG, W., ZHANG, T., LIANG, G., HU, B., HAN, P., GONG, W. Assessing transfer of pesticide residues from chrysanthemum flowers into tea solution and associated health risks. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 187, p. 109859, 2020.

NAGAYAMA, T. Behavior of residual organophosphorus pesticides in foodstuffs during leaching or cooking. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n.8, p. 2388-2393, 1996.

PINTO, M., S. Tea: A new perspective on health benefits. **Food research international**, v. 53, p.558-567, 2013.

RAMESHRAD, M., RAZAVI, B. M., & HOSSEINZADEH, H. Protective effects of green tea and its main constituents against natural and chemical toxins: A comprehensive review. **Food and chemical toxicology**, v. 100, p. 115-137, 2017.

RODRIGUES, A. A. Z., DE QUEIROZ, M. E. L. R., FARONI, L. R. D. A., PRATES, L. H. F., NEVES, A. A., DE OLIVEIRA, A. F., FREITAS, J. F., HELENO F. F. & ZAMBOLIM, L. The efficacy of washing strategies in the elimination of fungicide residues and the alterations on the quality of bell peppers. **Food Research International**, v. 147, p. 110579, 2021.

RODRIGUES, A. A. Z., NEVES, A. A., DE QUEIROZ, M. E. L. R., DE OLIVEIRA, A. F., PRATES, L. H. F., & MORAIS, E. H. C., Optimization and validation of the salting-out assisted liquid-liquid extraction method and analysis by gas chromatography to determine pesticides in water. **Eclética Química**, v. 43, p. 11-21, 2018.

SARMA, A., BANIA, R., & Das, M. K. Green tea: Current trends and prospects in nutraceutical and pharmaceutical aspects. **Journal of Herbal Medicine**, p.100694, 2023.

SHENDY, A. H., ELTANANY, B. M., AL-GHOBASHY, M. A., GADALLA, S. A., MAMDOUH, W., LOTFY, H. M. Coupling of GC-MS/MS to principal component analysis for assessment of matrix effect: Efficient determination of ultra-low levels of pesticide residues in some functional foods. **Food Analytical Methods**, v. 12, p. 2870-2885, 2019.

SILVA, T. L., DE QUEIROZ, M. E. L., DE OLIVEIRA, A. F., RODRIGUES, A. A., NEVES, A. A., VIEIRA, P. A., DE QUEIROZ, J. H., & BARBOSA, V. O. D. P. Microextraction technique associated with gas chromatography–mass spectrometry for determining pesticide residues in urine. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 57, p. 165-175, 2022.

SZTERNFELD, P., DEMOURY, C., BRIAN, W., MICHELET, J. Y., VAN LEEUW, V., VAN HOECK, E., & JOLY, L. Modelling the pesticide transfer during tea and herbal tea infusions by the identification of critical infusion parameters. **Food Chemistry**, v. 429, p. 136893, 2023.

TEWARY, D. K., KUMAR, V., RAVINDRANATH, S. D., SHANKER, A. Dissipation behavior of bifenthrin residues in tea and its brew. **Food Control**, v. 16, n.3, p. 231-237, 2005.

WAN, H., XIA, H., CHEN, Z. Extraction of pesticide residues in tea by water during the infusion process. **Food Additives & Contaminants**, v. 8, n.4, p. 497-500, 1991.

WANG, X., ZHOU, L., ZHANG, X., LUO, F., & CHEN, Z. Transfer of pesticide residue during tea brewing: Understanding the effects of pesticide's physico-chemical parameters on its transfer behavior. **Food research international**, v. 121, p.776-784, 2019.

XIAO, J. J., LI, Y., FANG, Q. K., SHI, Y. H., LIAO, M., WU, X. W., HUA, R., M., & CAO, H. Q. Factors affecting transfer of pyrethroid residues from herbal teas to infusion and influence of physicochemical properties of pesticides. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, p. 1157, 2017.

ZHOU, L., JIANG, Y., LIN, Q., WANG, X., ZHANG, X., XU, J., & CHEN, Z. Residue transfer and risk assessment of carbendazim in tea. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n.14, p. 5329-5334, 2018.

CONCLUSÃO GERAL

O método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP), seguido por uma etapa de *clean-up* (d-SPE), foi otimizado e validado para determinação de resíduos dos pesticidas pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina, em folhas desidratadas de chá verde utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Este método atendeu aos requisitos estabelecidos pela ANVISA, Resolução RDC nº 166/17. Esse método foi aplicado em folhas de chá verde, sendo detectado a bifentrina em duas amostras com concentrações acima do LMR permitido pela União Européia (0,07 mg kg⁻¹ e 0,20 mg kg⁻¹). O método também foi testado em outros tipos de chás, para avaliar a sua aplicabilidade, sendo detectado resíduos de pesticidas, a maioria acima do LMR permitido pela União Europeia. O pesticida pirimifós-metílico foi encontrado acima do LMR estabelecido pela União Europeia em cinco amostras sendo, uma de chá preto, uma de chá branco e três de erva-cidreira em concentrações variando de 0,06-0,6 mg kg⁻¹. O flutriafol foi identificado em uma amostra de chá de cavalinha, porém abaixo do Limite de Quantificação (LQ) e, portanto, abaixo do LMR. Em relação ao ciproconazol, este foi detectado na faixa de concentrações entre 0,11-0,85 mg kg⁻¹ sendo, duas amostras de erva-cidreira, uma de erva-doce, uma de cavalinha e uma de hortelã todas excedendo o LMR. A bifentrina foi detectada em uma amostra de cavalinha, uma de mate e uma de capim-limão, com concentrações variando de <LQ a 0,11 mg kg⁻¹. Como os chás são consumidos na forma de infusão, um método de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP) e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) foi também otimizado e validado para a determinação de pesticidas pirimifós-metílico, flutriafol, ciproconazol e bifentrina em infusões de chá verde. O método validado apresentou boa seletividade, linearidade e exatidão com uma faixa de recuperação de 86,0 a 102%, com precisão ≤ 17,8%. O limite de quantificação (LQ) foi de 0,0125 mg L⁻¹ para todos os analitos. Esses métodos foram empregados para avaliar a transferência dos pesticidas pirimifós-metílico, ciproconazol e bifentrina das folhas de chá verde para a sua infusão. Com base nos resultados obtidos, observou-se que para o ciproconazol a translocação foi mais significativa sendo, uma taxa entre 63,6% - 67,3% em temperatura de infusão de 100 °C e uma taxa de 47,0% - 52,2% para temperatura de 80 °C. Em seguida o pirimifós-metílico teve uma taxa para as temperaturas de 100 °C e 80 °C de 22,6% - 24,7% e 11,4% - 12,1%, respectivamente. Já a bifentrina apresentou a menor taxa de transferência, uma porcentagem variando entre 3,73% -3,88% para temperatura de infusão de 100 °C, enquanto para a temperatura de 80 °C os resultados ficaram abaixo do limite de quantificação (LQ). Observou-se uma correlação

entre a transferência dos pesticidas com o valor de K_{ow} e a solubilidade dos mesmos. Maior transferência foi observada para os compostos mais solúveis em água e que apresentam menor valor de K_{ow} . A maior taxa de transferência dos resíduos dos pesticidas ocorreu em temperatura mais elevada da água de infusão (100 °C), enquanto o tempo de infusão não influenciou significativamente na transferência dos pesticidas. Portanto, para minimizar a transferência de pesticidas para a infusão recomenda-se não ferver a água durante o seu preparo e também, evitar o uso de pesticidas altamente solúveis em água no cultivo do chá verde.