

ANNA ISABEL GUIDO COSTA

**ANÁLISE MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALFACE POR
CROMATOGRAFIA GASOSA**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011**

ANNA ISABEL GUIDO COSTA

**ANÁLISE MULTIRRESÍDUOS DE
AGROTÓXICOS EM ALFACE POR
CROMATOGRAFIA GASOSA**

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

APROVADA: 11 de fevereiro de 2011

Prof. Laércio Zambolim
(Coorientador)

Prof. José Humberto de Queiroz

Prof. André Fernando de Oliveira

Prof. Antônio Augusto Neves
(Coorientador)

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

*A Deus,
Aos meus pais Paulo e Maria Inês,
Às minhas irmãs Marina e Letícia*

*Com muito amor e carinho,
dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela força e coragem que me ajudaram a chegar até aqui;

Aos meus pais, Paulo e Maria Inês, pelo amor, confiança e incentivo. Amo muito vocês;

Às minhas irmãs Marina e Letícia pelo companheirismo e amizade;

Às minhas amigas, Flaviane, Juliana, Vânia, Fernanda, Renata, Lívia, Maiby, Elenice, Simone Goulart e Lara e aos meus amigos Carlos e Tiago pela amizade, segurança e acolhimento;

À Universidade Federal de Viçosa, particularmente ao Departamento de Química, pela recepção e pela oportunidade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Capes/Reuni, pela concessão da bolsa de estudos;

De maneira bem especial, aos professores Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e Antônio Augusto Neves, pela orientação, acolhimento e amizade;

Ao professor Laércio Zambolim pela grande contribuição ao meu trabalho;

Aos técnicos Ricardo (LAQUA), Sérgio (Laboratório de Fitotecnia), Paulo e Joelson (Departamento de Fitotecnia) pela disponibilidade e boa vontade em me ajudar;

Ao Laboratório de Doenças de Plantas do Departamento de Fitopatologia da UFV, por ter cedido as amostras de alface orgânica;

A todos os amigos do LAQUA: Alessandra, Elisa, Bárbara Diniz, Carol, Cláudia, Guilherme, Laercio, Luciana, Luiz Manoel, Simone Mairink, Soraia, Tamires, Romenique, Adley, Bárbara Sábado e Bruno, que de alguma forma contribuíram para a conquista e concretização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ANNA ISABEL GUIDO COSTA, filha de Paulo Edgar da Costa e Maria Inês Guido da Costa, nasceu em Caratinga, Minas Gerais, em 30 de março de 1983.

Em março de 2002, iniciou o Curso de Licenciatura Plena em Química, pelo Centro Universitário de Caratinga - UNEC, diplomando-se como licenciada em agosto de 2005. Em fevereiro de 2006, iniciou a complementação para o título de Bacharel em Química, também pelo Centro Universitário de Caratinga - UNEC, diplomando-se como bacharel em dezembro de 2006.

Em março de 2009, iniciou o curso de pós-graduação em Agroquímica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa - UFV, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2011.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. A cultura da alface.....	3
2.2. Agrotóxicos na cultura da alface.....	10
2.3. Técnicas de extração de multirresíduos.....	16
2.4. Técnicas de análise multirresíduo.....	19
2.5. Efeito de matriz.....	20
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivos gerais.....	22
3.2. Objetivos específicos.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1. Preparo de soluções-padrão.....	23
4.2. Análise cromatográfica.....	24
4.3. Amostras de alface.....	24
4.4. Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT).....	25
4.4.1. Preparo e fortificação das amostras de alface.....	25
4.4.2. Extração dos agrotóxicos em alface.....	25
4.5. Otimização da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT).....	26
4.5.1. Adição de água.....	26
4.5.2. Solventes extratores.....	26
4.5.3. Modo e tempo de agitação.....	27
4.5.4. Efeito do pH.....	27
4.5.5. Força iônica.....	28
4.5.6. Tempo de congelamento.....	28

4.5.7. Tempo de centrifugação.....	28
4.5.8. Volume de mistura extratora e massa de amostra.....	29
4.6. Eficiência da etapa de <i>clean-up</i> dos extratos de alface.....	29
4.6.1. <i>Clean-up</i> com os adsorventes florisil e sílica gel.....	29
4.6.2. <i>Clean-up</i> com carvão ativado.....	30
4.7. Estudo da estabilidade do analito no solvente e no extrato da matriz.....	30
4.7.1. Estabilidade do analito no solvente.....	30
4.7.2. Estabilidade do analito no extrato da matriz.....	31
4.8. Linearidade de resposta do detector.....	32
4.9. Validação do método analítico.....	32
4.9.1. Seletividade.....	32
4.9.2. Limite de detecção e limite de quantificação.....	33
4.9.3. Linearidade de resposta do método.....	33
4.9.4. Exatidão.....	34
4.9.5. Precisão.....	34
4.9.5.1. Repetitividade.....	34
4.9.5.2. Precisão intermediária.....	35
4.10. Avaliação do efeito de matriz.....	35
4.11. Aplicação do método.....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1. Análise cromatográfica.....	39
5.2. Otimização da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura.....	41
5.2.1. Adição de água.....	41
5.2.2. Solventes extratores.....	43
5.2.3. Modo e tempo de agitação.....	45
5.2.4. Efeito do pH.....	46
5.2.5. Força iônica.....	48
5.2.6. Tempo de congelamento.....	50
5.2.7. Tempo de centrifugação.....	52
5.2.8. Volume de mistura extratora e massa de amostra.....	53
5.3. Metodologia otimizada.....	54
5.4. Eficiência da etapa de <i>clean-up</i> dos extratos de alface.....	54
5.4.1. <i>Clean-up</i> com os adsorventes florisil e sílica gel.....	55

5.4.2. <i>Clean-up</i> com carvão ativado.....	57
5.7. Estudo da estabilidade do analito no solvente e no extrato da matriz.....	59
5.7.1. Estabilidade do analito no solvente.....	59
5.7.2. Estabilidade do analito no extrato da matriz.....	61
5.8. Linearidade de resposta do detector.....	64
5.9. Validação do método analítico.....	66
5.9.1. Seletividade.....	66
5.9.2. Limite de detecção e limite de quantificação.....	68
5.9.3. Faixa analítica de resposta do método.....	69
5.9.4. Exatidão.....	72
5.9.5. Precisão.....	74
5.9.5.1. Repetitividade.....	74
5.9.5.2. Precisão intermediária.....	75
5.10. Avaliação do efeito de matriz.....	76
5.11. Aplicação do método.....	83
6. CONCLUSÕES.....	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS

AGROFIT - Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPA - Boas Práticas Agrícolas
CG – Cromatografia em Fase Gasosa
CG-DCE - Cromatógrafo a Gás com Detector por Captura de Elétrons
GC-FPD - Cromatografia Gasosa com Detector Fotométrico de Chama
CL – Cromatografia em Fase Líquida
CV - Coeficiente de Variação
DL₅₀ – Dose Média Letal
DMFS - Dispersão de Matriz em Fase Sólida
DV - Desvio-Padrão
EFS - Extração em Fase Sólida
ELL - Extração Líquido-Líquido
ELL-PBT - Extração Líquido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura
ESL-PBT - Extração Sólido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura
FAO - Food and Agriculture Organisation
HPLC – High-performance Liquid Chromatography
IAs – Ingredientes Ativos
LAQUA - Laboratório de Química Analítica
LD - Limite de Detecção
LMR - Limite Máximo de Resíduo
LQ - Limite de Quantificação
MAE - Microwave-Assisted Extraction
MEFS - Microextração em Fase Sólida
NPD – Detector de Nitrogênio e Fósforo
OMS – Organização Mundial da Saúde
PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PLE - Pressurised Liquid Extraction
R² - Coeficiente de Determinação
R % - Porcentagem de Recuperação
r – Coeficiente de Correlação
SBSE - Stir-Bar Sorptive Extraction

SFE - Supercritical Fluid Extraction

SINDAG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola

SPME - Solid-Phase Micro-Extraction

t_R - Tempo de Retenção

UV - Ultra-Violeta

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Composição nutricional média para 100 g de folha de alface do tipo lisa.
- Tabela 2. Agrotóxicos encontrados nas amostras de alface nas análises do PARA de 2002 a 2009.
- Tabela 3. Agrotóxicos selecionados.
- Tabela 4. LMR's para os agrotóxicos selecionados.
- Tabela 5. Modo e tempo de agitação da mistura amostra: solução extratora.
- Tabela 6. Agrotóxicos aplicados em experimento na cultura de alface.
- Tabela 7. Dose aplicada e produto formulado dos agrotóxicos.
- Tabela 8. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método para os onze agrotóxicos.
- Tabela 9. Coeficientes de correlação obtidos para cada composto.
- Tabela 10. Porcentagens de recuperação (% R) e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de extratos de amostra de alface fortificada com os agrotóxicos em três concentrações diferentes.
- Tabela 11. Porcentagem de recuperação (% R) e coeficiente de variação (CV) obtido após sete extrações dos agrotóxicos em amostra de alface.
- Tabela 12. Porcentagem de recuperação (% R) e coeficiente de variação (CV) obtidos após análise em dias diferentes, pelo mesmo analista.
- Tabela 13. Concentrações dos princípios ativos ao longo dos dias de coleta após a aplicação dos mesmos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Alface do tipo repolhuda lisa (HENZ e SUINAGA, 2009).
- Figura 2. Alface do tipo Repolhuda Crespa ou Americana (HENZ e SUINAGA, 2009).
- Figura 3. Alface do tipo Solta Crespa (HENZ e SUINAGA, 2009).
- Figura 4. Alface do tipo Solta Crespa Roxa (HENZ e SUINAGA, 2009).
- Figura 5. Alface do tipo Romana (HENZ e SUINAGA, 2009).
- Figura 6. Sintomas da Septoriose causada pelo fungo *Septoria lactucae* Pass. (AGROFIT, 2010).
- Figura 7. Sintomas do Míldio causado pelo fungo *Bremia latucae* Regel (AGROFIT, 2010).
- Figura 8. Sintomas da Podridão-de-Sclerotinia causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary (AGROFIT, 2010).
- Figura 9. Pulgão-verde ou Pulgão-verde-claro (AGROLINK, 2010).
- Figura 10. Representação gráfica do estabelecimento dos valores de LD e LQ. (Adaptado de MISTURA, 2003).
- Figura 11. Horta experimental localizada no Campus da UFV, no Departamento de Agronomia.
- Figura 12. Cromatograma de uma solução-padrão dos agrotóxicos a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ para o clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, procimidona, endossulfam e cipermetrina; $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ para a iprodiona, permetrina e deltametrina; e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ para o tiametoxam onde: 1- clorotalonil:

$t_R = 4,94$; 2- parationa-metilica: $t_R = 5,35$; 3- clorpirifós: $t_R = 5,99$; 4- tiametoxam: $t_R = 6,24$; 5- procimidona: $t_R = 6,65$; 6- (α) endossulfam: $t_R = 6,92$; 7- (β) endossulfam: $t_R = 7,61$; 8- iprodiona: $t_R = 7,79$; 9- bifentrina (padrão interno): $t_R = 9,51$; 10 e 11- λ - cialotrina: $t_R = 10,66$ e $10,99$; 12 e 13- permetrina: $t_R = 12,30$ e $12,54$; 14, 15 e 16- cipermetrina: $t_R = 13,76$; $13,91$ e $14,00$; e 17 e 18- deltametrina: $t_R = 15,51$ e $15,74$ em acetonitrila.

Figura 13. Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em alface em função da quantidade de água.

Figura 14. Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em alface utilizando acetonitrila (ACN) e a mistura acetonitrila: acetato de etila (AcEtila) como solventes extratores.

Figura 15. Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em alface em função do modo e tempo de agitação.

Figura 16. Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em alface em função do pH da amostra.

Figura 17. Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em alface em função da força iônica da amostra.

Figura 18. Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em alface em função do tempo de congelamento.

Figura 19. Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em alface em função do tempo de centrifugação.

Figura 20. Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em alface variando a massa de amostra e volume de mistura extratora.

Figura 21. (A) Cromatograma do branco sem *clean-up*; (B) Cromatograma do branco passando pelo florissil na etapa de filtração; (C) Cromatograma do branco passando pelo cartucho com florissil.

Figura 22. (A) Cromatograma do branco sem *clean-up*; (B) Cromatograma do branco passando pela sílica gel na etapa de filtração; (C) Cromatograma do branco passando pelo cartucho com sílica gel.

Figura 23. (A) Cromatograma do branco sem *clean-up*; (B) Cromatograma de um padrão em acetonitrila; (C) Cromatograma de uma amostra fortificada que passou pelo método ESL-PBT utilizando a etapa de *clean-up*.

Figura 24. (A) Comportamento dos analitos em solução no solvente armazenada em freezer; (B) Comportamento dos analitos exposta ao ambiente.

Figura 25. (A) Comportamento dos analitos em solução no extrato armazenada em freezer; (B) Comportamento dos analitos no extrato exposta ao ambiente.

Figura 26. (A) Espectro de absorção do extrato ao longo das quatro semanas em freezer, (B) Espectro de absorção do extrato exposto ao ambiente ao longo das quatro semanas.

Figura 27. Curvas analíticas preparadas a partir de soluções-padrão dos agrotóxicos em estudo na faixa de concentração entre 10,0 e 400,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ analisadas por CG-DCE.

Figura 28. Cromatograma de extrato obtido de uma amostra de alface (A) isenta dos analitos; (B) contendo os analitos a 0,1 mg L^{-1} para o clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, procimidona, endossulfam e cipermetrina; 0,2 mg L^{-1} para a iprodiona, permetrina e deltametrina; e 0,5 mg L^{-1} para o tiametoxam onde: 1- clorotalonil: $t_R = 4,94$; 2- parationa-metílica: $t_R = 5,35$; 3- clorpirifós: $t_R = 5,99$; 4-

tiametoxam: $t_R = 6,24$; 5- procimidona: $t_R = 6,65$; 6- (α) endossulfam: $t_R = 6,92$; 7- (β) endossulfam: $t_R = 7,61$; 8- iprodiona: $t_R = 7,79$; 9- bifentrina (padrão interno): $t_R = 9,51$; 10 e 11- λ - cialotrina: $t_R = 10,66$ e $10,99$; 12 e 13- permetrina: $t_R = 12,30$ e $12,54$; 14, 15 e 16- cipermetrina: $t_R = 13,76$; $13,91$ e $14,00$; e 17 e 18- deltametrina: $t_R = 15,51$ e $15,74$.

Figura 29. Curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de alface fortificadas com padrão dos analitos em estudo na faixa de concentração entre $0,6$ e $1098,4 \mu\text{g L}^{-1}$ analisados por CG-DCE.

Figura 30. Curvas analíticas preparadas em acetonitrila e no branco da matriz para cada agrotóxico em estudo.

Figura 31. Grau do efeito de matriz para os agrotóxicos em estudo em amostra de alface.

RESUMO

COSTA, Anna Isabel Guido, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Análise multirresíduos de agrotóxicos em alface por cromatografia gasosa.** Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Coorientadores: Antônio Augusto Neves e Laércio Zambolim.

A alface (*Lactuca sativa L.*) é uma das formas de salada *in natura* mais consumida por todas as classes sociais brasileiras. É, portanto, de extrema importância para a segurança alimentar o monitoramento e avaliação dos aspectos relacionados à sua produção e consumo. Neste estudo, foi otimizada e validada uma metodologia para a determinação, em amostras de alface, de resíduos de 11 agrotóxicos (clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, tiametoxam, procimidona, endossulfam, iprodiona, λ -cialotrina, permectrina, cipermetrina e deltametrina) utilizando a técnica de ESL-PBT e análise por Cromatografia Gasosa com Detector por Captura de Elétrons (CG-DCE). Na otimização univariada do método foram avaliados parâmetros que pudessem influenciar na extração dos agrotóxicos como: adição de água, solvente extrator, modo e tempo de agitação, efeito do pH, força iônica, tempo de congelamento, tempo de centrifugação e volume de solvente extrator e massa de amostra. O método otimizado consiste em acrescentar a 4,0000 g de alface, 1,0 mL de água, 6,5 mL de acetonitrila e 1,5 mL de acetato de etila verificando-se a formação de fase única. Essa mistura é então, agitada em mesa agitadora (10 minutos), centrifugada por 3 minutos a 1200 g e levada ao freezer à -20 °C por 3 horas. Nestas condições as fases são separadas e o extrato orgânico, contendo os princípios ativos é passado por um papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro. Esse extrato é recuperado e analisado por CG-DCE. A técnica otimizada foi validada, determinando as principais figuras de mérito, tais como: seletividade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, exatidão e precisão. Avaliou-se também o efeito de matriz na quantificação desses princípios ativos por CG-DCE através do método de adição de padrão. Os resultados indicam que o método de ESL-PBT é eficiente para a extração dos onze agrotóxicos em amostras de alface, mostrando porcentagens de

recuperação maiores que 57,0% e menores que 103,0%. Os limites de detecção e quantificação do método foram de 0,0004 a 0,0520 mg kg⁻¹ e 0,0012 a 0,1716 mg kg⁻¹, respectivamente. O efeito de matriz mostrou-se presente na quantificação dos agrotóxicos por cromatografia gasosa. A técnica otimizada e validada foi aplicada na análise de resíduos de clorotalonil, tiametoxam, procimidona e iprodiona em alface, que foram pulverizados em uma horta experimental de acordo com as boas práticas agrícolas respeitando o intervalo de segurança de cada produto. No estudo da estabilidade dos compostos no solvente, observou-se que analitos como permetrina e procimidona, são bastante estáveis em acetonitrila tanto quando armazenado em freezer quanto expostos ao ambiente. Já os outros compostos tiveram um comportamento de maior instabilidade. Quanto ao estudo da estabilidade dos compostos no extrato da matriz, concluiu-se que a degradação dos co-extrativos ao longo do período de monitoramento espectrofotométrico, não influenciou na estabilidade dos analitos na solução. Dessa forma, a otimização da técnica ESL-PBT para extração de resíduos de agrotóxicos em amostras de alface e análise por CG-DCE resultou em um método simples, eficaz, com pequeno consumo de solvente e baixo custo.

ABSTRACT

COSTA, Anna Isabel Guido, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Multiresidue analysis of pesticides in lettuce by gas chromatography.** Adviser: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-Advisers: Antônio Augusto Neves and Laércio Zambolim.

Lettuce (*Lactuca sativa L.*) is one of the most fresh salad consumed by all social classes in Brazil. It is very important for food security, the monitoring and evaluation of all aspects related to production and consumption. In this study, was optimized and validated a methodology for determining, in samples of lettuce, the residues of eleven pesticides (chlorothalonil, parathion-methyl, chlorpyrifos, thiamethoxam, procymidone, endosulfan, iprodione, lambda-cyhalothrin, permethrin, cypermethrin and deltamethrin). Using the method of SLE-LTP and analysis by Gas Chromatography with Electron Capture Detector (GC – ECD). In the optimization of univariate method were assessed parameters that could influence the extraction of pesticides as adding water, organic solvent, time and mode of stirring, effect of pH, ionic strength, freezing and centrifugation times, volume of organic solvent and sample mass. The optimized method consists of adding to 4.0000 g of lettuce, 1.0 mL of water, 6.5 mL of acetonitrile and 1.5 mL of ethyl acetate and checking the formation of one single phase. This mixture is agitated on a shaker (10 min.), centrifuged for 3 minutes at 1200 g and taken to a freezer at -20 °C for 3 hours. Under these conditions the phases are separated and the organic extract containing the active ingredient is passed through a filter paper containing anhydrous sodium sulfate. This extract is recovered and analyzed GC-ECD. The optimized technique was validated by determining the main figures of merit such as selectivity, linearity, limits of detection and quantification, accuracy and precision. Was evaluated the matrix effect on quantification of active principles by GC-ECD. The results indicates that SLE-LTP is an efficient method for the extraction of the eleven pesticides in samples of lettuce, showing recovery percentages greater than 57.0% and less 103.0%. The limits of detection and quantification were 0.0004 to 0.0520 mg.kg⁻¹ and from 0.0012 to 0.1716 mg.kg⁻¹

¹, respectively. The matrix effect was present in the quantification of pesticides by gas chromatography. The optimized and validated technique was applied to the analysis of residues of chlorothalonil, thiamethoxan, procymidone and iprodione in lettuce, which were sprayed in an experimental garden in accord with good agricultural practices, respecting the security space of each product. In the study of the stability in the solvent, was observed that analytes such as permethrine and procymidone are quite stable, even when stored in freezer or exposed to the environment. The other compounds showed more instability behavior. The other compounds in the matrix-extract, it is concluded that co-extractives degradation during the period of spectrophotometric monitoring did not influence the stability of analytes in solution. Thus, the optimization of SPE-LTP technique and analysis by CG-ECD samples of lettuce for the extraction pesticides residues resulted in a simple, effective, whit a little solvent consumption and low cost method.

1. INTRODUÇÃO

A produção agrícola é intensamente afetada por pragas, doenças e plantas daninhas, sendo necessária a utilização de agrotóxicos de diversas classes químicas, dentre as quais citam-se os inseticidas, acaricidas, fungicidas e herbicidas para manter o potencial produtivo e a qualidade dos produtos (COUTINHO *et al.*, 2005).

Os agrotóxicos possibilitam a manutenção do potencial produtivo das culturas e têm auxiliado no controle de vetores de diversas doenças. Entretanto, seu uso desordenado e excessivo vem provocando impactos sobre o ambiente. Além do impacto ambiental causado, o uso indiscriminado dos agrotóxicos causa a contaminação dos alimentos, em níveis, às vezes, muito altos causando problemas de saúde ao consumidor (LAMBROPOULOU e ALBANIS, 2002).

Em função disso, avaliar a qualidade dos alimentos que estão sendo consumidos pela população, caracterizar as possíveis fontes de contaminação, avaliar quanto ao uso inadequado e não autorizado de agrotóxicos e estimular a adoção de Boas Práticas Agrícolas (BPA) nos mais diversos tipos de culturas desenvolvidas no país, têm se tornado imprescindível (ANVISA, 2005).

Atentos às necessidades acima citadas com relação aos alimentos produzidos e consumidos no Brasil, o governo Federal através da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), propôs, no ano de 2001, um Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA, que monitora resíduos de agrotóxicos em alimentos em alguns Estados, como: Acre, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Tocantins, etc.

Por ser uma das formas de salada *in natura* mais consumida por todas

as classes sociais brasileiras, a alface (*Lactuca sativa L.*), é uma cultura que merece destaque. De acordo com os relatórios emitidos pelo PARA no decorrer dos anos de 2002 a 2009 os resultados insatisfatórios para as amostras de alface analisadas referem-se principalmente à presença de resíduos de IAs (ingredientes ativos) não autorizados para a cultura.

Os principais princípios ativos encontrados nesta matriz no decorrer destes anos foram: clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, tiametoxam, procimidona, endossulfam, iprodiona, λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina, sendo a procimidona, a iprodiona e o tiametoxam autorizados para a cultura e o clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, endossulfam, λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina não-autorizados para a cultura (ANVISA, 2010a; ANVISA, 2010b; ANVISA, 2010c).

Normalmente, as técnicas recomendadas para a extração e análise desses princípios ativos consomem grande quantidade de solvente e de amostra (FENOLL, *et al.*, 2007a; RISSATO, *et al.*, 2005). Diante desta problemática, o Laqua, Laboratório de Química Analítica da UFV, vem desenvolvendo e aprimorando técnicas de extração e análise de agrotóxicos em diferentes matrizes como leite (GOULART *et al.*, 2008), água (VIEIRA *et al.*, 2007), batata (DARDENGO, 2007) e maçã (PUSSENTE, 2008) buscando a utilização de uma menor quantidade de solvente extrator possível e de amostra. Uma dessas técnicas é a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT), tendo-se comprovado resultados satisfatórios para a maioria dos princípios ativos estudados.

No desenvolvimento deste trabalho pretende-se adaptar, otimizar e validar esta técnica para extração de princípios ativos autorizados e não-autorizados na cultura de alface, almejando disponibilizar futuramente esta técnica para análise multirresíduos em alface.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é originária da Europa e da Ásia Ocidental (FILGUEIRA, 2003). Trata-se de uma cultura popular e de uso extensivo, por possuir um ciclo relativamente curto e com alta produção por área. Foi introduzida nas Américas no século XVI, sendo cultivada no Brasil desde 1647 (SILVA, 1997).

É uma hortaliça pertencente à família Asteraceae, da subfamília Cichoriaceae. É mundialmente conhecida e consumida em forma de salada *in natura*, sendo fonte de vitaminas A, B1, B2 e C, e sais minerais como cálcio e ferro, além de apresentar baixo teor de calorias. É a principal hortaliça folhosa comercializada e consumida pela população brasileira pela facilidade de aquisição e por ser produzida durante o ano inteiro (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Na Tabela 1 tem-se a composição nutricional média para 100 g de folha de alface do tipo lisa.

Trata-se de uma planta herbácea, com caule curto, não ramificado, ao qual se prendem as folhas que são relativamente grandes. A coloração das folhas varia de verde a verde-amarelada, sendo algumas cultivares de cor arroxeada. É colhida através de arranquio da planta inteira, antes do início do alongamento do caule. Após esse período, termina o interesse comercial da planta como hortaliça para consumo fresco, porque diminuem muito as propriedades organolépticas. As raízes são do tipo pivotante, podendo atingir até cerca de 60 cm de profundidade, sendo que 80% do sistema radicular exploram apenas os primeiros 25 cm de solo (FILGUEIRA, 2000).

O solo ideal para o cultivo dessa hortaliça é o de textura média, rico em matéria orgânica e com boa disponibilidade de nutrientes. Para se obter maior

produtividade, é necessário o uso de insumos que melhorem as condições físicas, químicas e biológicas do solo. As maiores produções podem ser obtidas a partir da melhoria das características químicas e físico-química do solo, o que pode ser obtida com o acréscimo de doses crescentes de compostos orgânicos (SOUZA *et al.*, 2005).

Tabela 1. Composição nutricional média para 100 g de folha de alface do tipo lisa.

Nutriente	Quantidade
Proteína	1,7 g
Lipídeos	0,1 g
Carboidratos	2,4 g
Fibra Alimentar	2,3 g
Cálcio	28,0 mg
Magnésio	9,0 mg
Ferro	0,6 mg
Sódio	4,0 mg
Potássio	349,0 mg
Zinco	0,7 mg
Tiamina	0,09 mg
Riboflavina	0,08 mg

Fonte: UNICAMP, 2010.

Nos últimos anos, o consumidor brasileiro tem tido mais acesso a informação e por isto tem demandado produtos mais diversificados. No Brasil, as alfaces mais conhecidas e consumidas são as crespas e as lisas, algumas das quais foram melhoradas para o cultivo de verão ou adaptadas para regiões tropicais, com temperaturas e pluviosidade elevadas, mas nos últimos anos também aparecerem cultivares roxas e com as folhas frisadas (HENZ e SUINAGA, 2009).

As cultivares de alface atualmente disponíveis no mercado brasileiro de sementes podem ser agrupadas em cinco tipos morfológicos principais, com base na formação de cabeça e tipo de folhas:

- a) Repolhuda Lisa: apresenta folhas lisas, delicadas e macias, com nervuras pouco salientes, com aspecto oleoso (“manteiga”), formando uma cabeça típica e compacta. Cultivares ‘Áurea’, ‘Aurélia’, ‘Aurora’,

'Babá de Verão', 'Boston Branca', 'Brasil 202', 'Brasil 303', 'Carla', 'Carolina AG 576', 'Crioula Branca', 'Elisa', 'Floresta', 'Glória', 'Kagraner de Verão', 'Karina', 'Lívia', 'Luisa', 'Marina', 'Maravilha de Inverno', 'Maravilha de Verão', 'Minie', 'Piracicaba 65', 'Rainha de Maio' (Figura 1).



Figura 1. Alface do tipo repolhuda lisa (HENZ e SUINAGA, 2009).

b) Repolhuda Crespa ou Americana: folhas crespas, consistentes e crocantes, cabeça grande e bem compacta. Cultivares 'América Delícia', 'Bounty Empire', 'Crespa Repolhuda', 'Grandes Lagos', 'Great Lakes', 'Great Lakes 659-700', 'Hanson', 'Iara', 'Lorca', 'Lucy Brown', 'Madona AG 605', 'Mesa 659', 'Nabuco', 'Raider', 'Salinas', 'Summertime', 'Tainá' (Figura 2).



Figura 2. Alface do tipo Repolhuda Crespa ou Americana (HENZ e SUINAGA, 2009).

c) Solta Lisa: folhas lisas e soltas, relativamente delicadas, sem formação de cabeça compacta. Cultivares 'Babá', 'Babá de Verão', 'Monalisa AG 819', 'Regina', 'Regina 71', 'Regina 440', 'Regina 579', 'Regina de Verão', 'Vitória de Verão'.

- d) Solta Crespa: folhas grandes e crespas, textura macia, mas consistente, sem formação de cabeça; pode ter coloração verde ou roxa (Figura 3). Cultivares 'Black Seeded Simpson', 'Brisa', 'Elba', 'Grand Rapids', 'Grand Rapids Nacional', 'Grand Rapids TBR', 'Grande Rápida', 'Hortência', 'Itapuã 401', 'Marianne', 'Marisa AG 216', 'Mimosa (Salad Bowl)', 'Salad Bowl', 'Simpson', 'Vanessa', 'Verônica', 'Vera (AF-470)'.



Figura 3. Alface do tipo Solta Crespa (HENZ e SUINAGA, 2009).

- e) Solta Crespa Roxa: 'Maravilha Quatro Estações', 'Mimosa Vermelha', 'Quatro Estações', 'Rossimo', 'Salad Bowl Roxa', 'Veneza Roxa', 'Vermelha Ruby' (Figura 4).



Figura 4. Alface do tipo Solta Crespa Roxa (HENZ e SUINAGA, 2009).

- f) Tipo Romana: folhas tipicamente alongadas, duras, com nervuras claras, com uma cabeça fofa e alongada, na forma de cone (Figura 5). Cultivares 'Branca de Paris', 'Ideal Cos', 'Romana Balão'.



Figura 5. Alface do tipo Romana (HENZ e SUINAGA, 2009).

No Brasil a alface é a 4^a hortaliça em importância tanto pela área cultivada quanto pelo valor das produções, ficando atrás apenas da batata, tomate e cebola (MELLO *et al.*, 2003). É a hortaliça folhosa de maior aceitação pelo consumidor (YURI *et al.*, 2002).

De acordo com o Censo Agropecuário de 2006, a produção brasileira de alface chegou a 525602 t, perdendo apenas para a produção de tomate (estaqueado) com 929962 t. A região Sudeste é responsável por 67% da produção brasileira, sendo o estado de São Paulo responsável por 47% da produção da região sudeste, seguido do estado do Rio de Janeiro com 41%, Minas Gerais com 10% e do Espírito Santo com 2% da produção (IBGE, 2010).

A grande suscetibilidade da alface às doenças torna-se um fator de limitação na produção dessa hortaliça. Segundo FILGUEIRA, 2003, são conhecidos aproximadamente 75 diferentes tipos de doenças, destacando-se tombamento, queima, podridão, míldio, manchas causadas por fungos, bactérias e viroses. Entre as pragas estão a mosca branca, pulgão, mosca minadora, lagartas e tripés (FILGUEIRA, 2003).

A Septoriose (*Septoria lactucae*) ou mal-das-folhas da alface, causada pelo fungo *Septoria lactucae* Pass., é uma doença comum em épocas chuvosas nas regiões de clima ameno. As perdas são causadas principalmente pelas lesões necróticas no limbo foliar, que reduzem o valor comercial do produto. Em campos de produção de sementes ocorre má formação das mesmas, resultante dos danos causados às folhas. As folhas atacadas apresentam manchas necróticas, com tamanho e formas irregulares (Figura 6). Com a evolução da doença, as áreas atacadas adquirem coloração pardacenta, apresentando numerosos pontos escuros, que são os corpos de

frutificação do fungo (AGROFIT, 2010).



Figura 6. Sintomas da Septoriose causada pelo fungo *Septoria lactucae* Pass. (AGROFIT, 2010).

O Míldio (*Bremia lactucae*) é uma das doenças mais importantes da alface, causando grandes perdas sob condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno. Esta doença é causada pelo fungo *Bremia lactucae* Regel o qual produz manchas foliares amareladas que podem ocupar grandes áreas na lâmina foliar (Figura 7). *Bremia lactucae* ocorre praticamente em todo o Brasil, mas os sintomas são mais severos nas regiões mais frias e úmidas. É quase exclusivamente um patógeno das asteráceas, com apenas um registro de incidência em tomateiro no México (AGROFIT, 2010).



Figura 7. Sintomas do Míldio causado pelo fungo *Bremia lactucae* Regel (AGROFIT, 2010).

O Tombamento também chamado de Damping-off ou Queima-da-Saia (*Rhizoctonia solani*), é uma doença da cultura da alface causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kühn que ocorre principalmente nas fases de germinação

das sementes e crescimento das mudas logo após o transplante. Esta doença reduz o número de mudas das sementeiras que irão para o campo. Prejudica também o desenvolvimento da cultura. Inicialmente ocorrem descoloração e necrose dos tecidos do coleto e das raízes das plântulas, provocando o tombamento e o apodrecimento. Em plantas mais desenvolvidas ocorrem amarelecimento e murcha, podendo ocorrer morte (AGROFIT, 2010).

A Podridão-de-Sclerotinia ou Mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) é causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary., que tem como sinônimo *Whetzelinia sclerotiorum* (Lib.) Korf & Dumont. Esse fungo possui um grande número de hospedeiras e uma vasta distribuição geográfica. No Brasil, a incidência da doença é relatada em vários estados, como Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo. As plantas são atacadas em todas as fases de desenvolvimento, apresentando sintomas parecidos aos da Queima-da-Saia causada por *Rhizoctonia solani*. A doença inicia-se no caule, passando para a base das folhas, provocando apodrecimento. A região do colo apresenta necrose, e na superfície de todos os tecidos próximos há a formação de micélio branco, cotonoso, com presença de escleródios com formato de grãos de arroz (Figura 8), que são inicialmente de coloração branca, tornando-se pretos posteriormente (AGROFIT, 2010).



Figura 8. Sintomas da Podridão-de-Sclerotinia causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary (AGROFIT, 2010).

O Pulgão-verde ou Pulgão-verde-claro (*Myzus persicae*) trata-se de uma praga amplamente distribuída no Brasil, está comumente disseminada nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Ocorre nas culturas de alface, algodão, batata, berinjela, brócolis, couve, couve-flor, crisântemo, feijão, fumo, jiló, mamão, melancia,

melão, pepino, pêssego, pimenta, pimentão, repolho e tomate. O pulgão-verde provoca danos diretos e indiretos na cultura. Os danos diretos são provocados devido ao succionamento contínuo de seiva, que prejudica o crescimento da planta atacada. Os danos indiretos ocorrem com a picada do inseto na planta, que favorece a inoculação de vírus causadores de moléstias. O inseto causador é o *Aphis persicae* (Sulzer, 1776); *Myzodes persicae* (Sulzer, 1776) (Figura 9) pertencente à ordem e subordem: *Hemiptera/Homoptera* e à família *Aphididae* (AGROFIT, 2010).



Figura 9. Pulgão-verde ou Pulgão-verde-claro (AGROLINK, 2010).

2.2. Agrotóxicos na cultura da alface

Por afetarem diretamente a parte comercializável, as doenças e as pragas que atacam a cultura da alface não são toleradas e devem ser cuidadosamente controladas. Este controle pode ser realizado de forma biológica, cultural ou química.

O controle de doenças e pragas pelo emprego de compostos químicos (controle químico) teve início em 1867, quando o acetoarsenito de cobre, conhecido pelo nome de Verde Paris, foi preparado comercialmente e indicado no controle de uma grande variedade de pragas. Depois surgiu o arseniato de chumbo ($PbHAsO_4$) utilizado como inseticida a partir de 1894, o dinitro-o-cresol em 1925, e o sulfato de tálio em 1930 (LARINI, 1999).

Os benefícios trazidos pelo uso de agrotóxicos estão relacionados com o potencial produtivo de alimentos, suprimindo assim grande parte da demanda mundial, mas em contrapartida, o problema de intoxicações por estes compostos preocupa as autoridades. Esta preocupação está no fato de que essas intoxicações acontecem pela ingestão gradativa destes produtos que contaminam a água, o solo e uma variedade de alimentos. O uso de muitos

destes compostos foi proibido devido à constatação do efeito cumulativo e prejudicial, que ocorre pela transferência de pequenas quantidades ao longo das cadeias alimentares (JORGENSEN, 2001).

Em função disso, avaliar a qualidade dos alimentos que estão sendo consumidos pela população, caracterizar as possíveis fontes de contaminação, avaliar quanto ao uso inadequado e não autorizado de agrotóxicos e estimular a adoção de Boas Práticas Agrícolas (BPA) nos mais diversos tipos de culturas desenvolvidas no país, têm se tornado imprescindível (ANVISA, 2005).

Atentos às necessidades acima citadas com relação aos alimentos produzidos e consumidos no Brasil fortalecendo a capacidade do governo em atender a segurança alimentar, o governo Federal através da Anvisa, propôs um Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA, que monitora resíduos de agrotóxicos em alimentos em diversos estados, brasileiros como: Acre, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rondônia, Roraima, Santa Catarina, Sergipe e Tocantins (ANVISA, 2010c).

Em 2009 foram monitoradas 20 culturas: abacaxi, alface, arroz, banana, batata, cebola, cenoura, feijão, laranja, maçã, mamão, manga, morango, pimentão, repolho, tomate, uva, couve, beterraba e pepino. A escolha destas culturas baseou-se nos dados de consumo obtidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), na disponibilidade destes alimentos nos supermercados das diferentes Unidades da Federação e no intensivo uso de agrotóxicos nestas culturas (ANVISA, 2010c).

De acordo com o PARA o maior problema no tocante aos níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura*, não está na forma de aplicação do produto na cultura além dos limites permitidos, mas sim no uso indiscriminado de agrotóxicos não autorizados para as culturas (ANVISA, 2010a).

Dessa forma, a seleção dos agrotóxicos para este estudo foi baseada nos resultados insatisfatórios para a cultura da alface mostrados nos relatórios emitidos pelo PARA no decorrer dos anos de 2002 a 2009 (Tabela 2). Estes resultados referem-se àquelas amostras que apresentaram ingredientes ativos de agrotóxicos acima do Limite Máximo de Resíduos (LMR) permitido ou

resíduos de IAs (ingredientes ativos) não autorizados para uma determinada cultura. Os resultados insatisfatórios foram: 2002 - 8,64%; 2003 - 6,67%; 2004 - 14,00%; 2005 - 46,45%; 2006 - 28,68%; 2007 - 40,00%; 2008 - 19,80 e 2009 - 38,4% (ANVISA, 2010a; ANVISA, 2010b; ANVISA, 2010c).

Tabela 2. Agrotóxicos encontrados nas amostras de alface nas análises do PARA de 2002 a 2009.

PARA	IAs autorizados (>LMR)	IAs autorizados (<LMR)	IAs não autorizados
2002		Procimidona	Acefato, Carbaril, Carbendazim, Clorpirifós, Clorotalonil, Ditiocarbamato, λ -cialotrina, Parationa-metílica
2003		Procimidona	Captan, Clorpirifós-etil, Clorotalonil, Deltametrina, Dimetoato, Ditiocarbamato, Endossulfam
2004		Azoxistrobina, Procimidona	Carbendazim, Clorotalonil, Deltametrina, Ditiocarbamato, Metamidofós, Parationa-metílica, Permetrina
2005		Iprodiona, Procimidona	Acefato, Clorpirifós, Clorotalonil, Dicofol, Ditiocarbamato, Endossulfam, Malationa, Metamidofós, Parationa-metílica
2006			Carbendazim, Ditiocarbamato, Fentoato, Metamidofós
2007		Procimidona	Ditiocarbamatos, Metamidofós, Acefato e Clorpirifós-etil
2008			Acefato, Carbaril, Carbendazim, Clorpirifós, Deltametrina, Dimetoato, Fempropatrina, Metamidofós, Metomil, Tebuconazol
2009	Difenoconazol		Ditiocarbamato, Carbendazim, Deltametrina, Metamidofós, Clorotalonil, λ -cialotrina, Clorpirifós, Acefato, Metomil, Carbaril, Endossulfam, Cipermetrina, Clorfenapir, Fipronil, Procloraz, Tebuconazol.

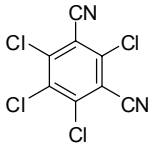
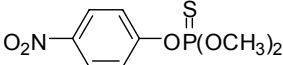
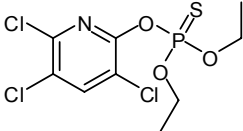
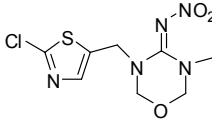
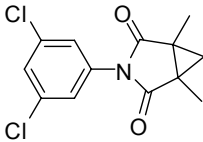
O Limite Máximo de Resíduos (LMR) é a concentração máxima de agrotóxicos legalmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo. É expressa em miligramas de resíduos por quilograma de alimento (mg kg^{-1}). É uma exigência devido ao risco potencial que os agrotóxicos oferecem ao homem através da alimentação, provocado pela exposição crônica diária (ANVISA, 2006).

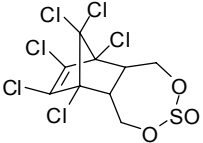
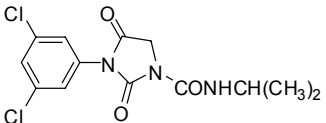
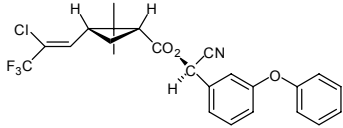
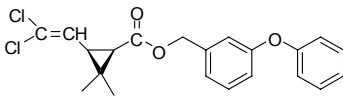
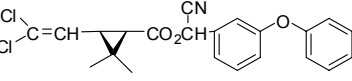
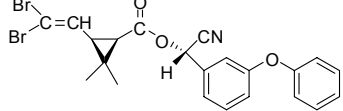
No âmbito internacional, esses limites são estabelecidos pela Comissão do *Codex Alimentarius*, segundo recomendações do grupo de peritos em resíduos de agrotóxicos das Organizações das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial de Saúde (OMS) (IMOTO, 2004).

No âmbito nacional, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão regulador responsável pela avaliação toxicológica dos agrotóxicos, estabelecendo o uso adequado para cada cultura e os limites máximos de resíduos permitidos (LMR's).

Os agrotóxicos selecionados que são autorizados de acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para o controle de doenças e pragas na cultura da alface são: tiametoxam, procimidona, iprodiona. E os não-autorizados são: clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, endossulfam, lambda-cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina (Tabela 3). Na Tabela 4 estão listados os LMR's para cada agrotóxico em estudo.

Tabela 3. Agrotóxicos selecionados.

Composto	Fórmula	Grupo Químico	Classe	Classificação toxicológica	Massa Molecular (g mol ⁻¹)	K _{ow} (pH 7,0 e a 20 °C)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	PE (°C) (760 mm Hg)
Clorotalonil (chlorothalonil)		Isoftalonitrila	Fungicida	Classe III	265,91	8,71x10 ²	8,10x10 ⁻¹	350,5
Parationa- metfílica (parathion- methyl)		Organofosforado	Inseticida e acaricida	Classe I	263,21	1,00x10 ³	5,50x10 ¹	334,7
Clorpirifós (chlorpyrifos)		Neonicotinóide	Inseticida, formicida e acaricida	Classe II	350,89	5,01x10 ⁴	1,05	375,9
Tiametoxan (thiamethoxam)		Neonicotinóide	Inseticida	Classe III	291,71	7,41x10 ⁻¹	4,10x10 ³	485,8
Procimidona (procymidone)		Dicarboximida	Fungicida	Classe IV	284,14	2,00x10 ³	2,46	477,9

Endossulfan (endosulfan)		Clorociclodieno	Acaricida, inseticida e formicida	Classe I	406,93	$5,62 \times 10^4$	$3,20 \times 10^{-1}$	449,7
Iprodiona (iprodione)		Dicarboximida	Fungicida	Classe IV	330,17	$1,26 \times 10^3$	$1,26 \times 10^3$	—
Lambda- cialotrina (lambda- cyhalothrin)	 <i>(R)-(Z)-(1S)-CIS</i>	Piretróide	Inseticida	Classe III	449,85	$7,94 \times 10^6$	$5,00 \times 10^{-3}$	498,9
Permetrina (permethrin)		Piretróide	Inseticida	Classe III	391,3	$1,26 \times 10^6$	$2,00 \times 10^{-1}$	465,9
Cipermetrina (cypermethrin)		Piretróide	Inseticida e formicida	Classe II	416,3	$2,00 \times 10^5$	$9,00 \times 10^{-3}$	511,3
Deltametrina (deltamethrin)		Piretróide	Inseticida e formicida	Classe III	505,2	$3,98 \times 10^4$	$2,00 \times 10^{-4}$	535,8

k_{ow} =coeficiente de partição octanol-água (pH7,0 e a 20 °C); PE= Ponto de Ebulição

Fonte: IUPAC, 2011; CHEMSPIDER, 2011.

Tabela 4. LMR's para os agrotóxicos selecionados.

Agrotóxicos	LMR's (mg kg ⁻¹)		
	Anvisa	Codex Alimentarius	União Européia (EU)
Clorotalonil	6,00	-	0,01
Parationa-metífica	-	-	0,02
Clorpirifós	-	-	0,05
Tiametoxam	0,05	-	5,00
Procimidona	5,00	5,00	5,00
Endossulfam	-	-	0,05
Iprodiona	1,00	10,00	10,00
Lambda-cialotrina	-	-	0,5
Permetrina	-	2,00	1,00
Cipermetrina	-	0,70	2,00
Deltametrina	-	2,00	0,50

Fonte: ANVISA, 2011; CODEX ALIMENTARIUS, 2011; UNIÃO EUROPÉIA, 2011).

2.3. Técnicas de extração de multirresíduos

O preparo da amostra é a etapa crucial dentro de um método analítico, principalmente quando se tratam de amostras sólidas ou semi-sólidas, tais como amostras ambientais e de alimentos, as quais geralmente não podem ser analisadas sem uma etapa prévia de preparo da amostra, devido aos baixos níveis de concentração em que os analitos estão presentes nestas matrizes (KRISTENSON *et al.*, 2006).

O objetivo principal do preparo da amostra é converter uma matriz real em uma amostra disponível para análise por técnicas instrumentais. Além disso, o preparo da amostra deve remover interferentes da matriz, aumentando assim, a seletividade do método, deve aumentar a concentração do analito, quando necessário, e fornecer um método robusto e reprodutível, o qual deve ser independente de variações no tipo da matriz (SMITH, 2003).

Um pré-tratamento eficiente das amostras é a chave para o sucesso das análises. Muitos métodos de preparo de amostras têm sido usados por décadas sem nenhuma modificação essencial ao longo dos anos. Sabendo-se que essa etapa é responsável por mais de 80% do tempo de consumo das

análises e que o sucesso das mesmas é determinado pela qualidade no preparo das amostras, principalmente de matrizes complexas, a melhoria neste procedimento é considerada urgente (HYÖTYLÄINEN, 2007).

Métodos clássicos, tais como Extração Líquido-Líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) e Extração por Soxhlet, para a determinação de agrotóxicos em alimentos e em amostras ambientais geralmente exigem uma grande quantidade de amostra, sorventes e solventes orgânicos de alta qualidade, além de muita manipulação dos extratos. Estes métodos são caros, em termos de tempo e de consumo de material, para responder com qualidade aos desafios modernos da análise de alimentos. O desenvolvimento de métodos mais rápidos e eficazes, visando baixo custo e menos contaminação ambiental é, portanto, uma exigência necessária (KRISTENSON *et al.*, 2006).

Muitas técnicas de extração tais como Extração por Fluido Supercrítico (SFE, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*) (RISSATO *et al.*, 2005; LEHOTAY, 1997), Extração Assistida por Microondas (MAE, do inglês *Microwave-Assisted Extraction*) (ESKILSSON e BJOËRKJUND, 2000) e Extração por Líquido Pressurizado (PLE, do inglês *Pressurised Liquid Extraction*) (BJOËRKLUND e NILSSON, 2000; RAMOS *et al.*, 2002) têm sido desenvolvidas na tentativa de superar as principais limitações dos métodos convencionais, como tempo de extração e consumo de solventes orgânicos. Em geral, estas técnicas alternativas permitem uma extração mais eficiente para os analitos presentes na matriz, devido ao maior contato do solvente de extração com os analitos de interesse (KRISTENSON *et al.*, 2006).

Procedimentos de Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*) (BALINOVA *et al.*, 2007; FARIA *et al.*, 2007) têm sido amplamente utilizados para análises de resíduos de pesticidas em amostras ambientais e de alimentos, os quais incluem várias abordagens, tais como Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSDP, do inglês *Matrix Solid-Phase Dispersion*) (VIANA *et al.*, 1996), Micro-Extração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid-Phase Micro-Extraction*) (LAMBROPOULOU e ALBANIS, 2002) e Extração Sortiva por Barra de Agitação (SBSE, do inglês *Stir-Bar Sorptive Extraction*) (BARRIADA-PEREIRA *et al.*, 2010). Estes métodos de extração representam uma possibilidade de redução do tempo de análise, consumo de solvente e diminuição de custos (PICÓ *et al.*, 2007).

Dentre os métodos de extração de agrotóxicos comumente empregados

em amostras de alface destacam-se a extração inicial por solvente seguida por particionamento líquido-líquido onde os analitos de interesse são transferidos para uma camada orgânica, deixando na fase aquosa os coextrativos indesejáveis e alguns pesticidas altamente polares (OVIEDO *et al.*, 2003; GELSOMINO *et al.*, 1997; FENOLL *et al.*, 2007a; FENOLL *et al.*, 2007b).

Atualmente as técnicas para análise de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais tem evoluído significativamente em termos de simplificação e melhoria de extração e purificação das amostras. Neste cenário, a técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) tem relevado bons resultados na extração de agrotóxicos em matrizes sólidas, devido à possibilidade de se realizar simultaneamente a extração de agrotóxicos e o *clean-up* dos extratos.

A técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) foi desenvolvida primeiramente por GOULART, 2004 na extração e análise de deltametrina e cipermetrina em leite por cromatografia gasosa. Posteriormente, a mesma técnica foi aplicada para diversas matrizes, como por exemplo, água (VIEIRA *et al.*, 2007), batata (DARDENGO, 2007), maçã (PUSSENTE, 2008), tomate (PINHO *et al.*, 2010) e abacaxi (COSTA, 2010) para extração simultânea de agrotóxicos das classes dos piretróides e organofosforados. A metodologia se mostrou simples e eficiente, além da vantagem de menor consumo de solventes, reduzindo ou evitando etapas de evaporação e troca de solventes.

Alguns solventes que podem ser empregados nesta técnica são acetonitrila, acetato de etila, metanol e acetona. Esta técnica simples, envolvendo a partição em baixa temperatura apresenta como vantagens: baixo consumo de solvente e ausência de etapas de clean-up, muitas vezes requeridas em vários outros métodos de extração.

O método consiste em colocar a amostra líquida ou sólida em contato com um solvente extrator, miscível em água, menos denso que a água e que se mantenha líquido a -20 °C. Posteriormente, a mistura, constituída de amostra e mistura extratora é agitada e levada ao freezer por um período mínimo de seis horas. Nesta etapa, a fase aquosa junto com a amostra congela, ficando na parte inferior do recipiente utilizado, e a fase superior, contendo o solvente e os agrotóxicos extraídos, é filtrada, utilizando sulfato de sódio anidro com o intuito de eliminar possível presença de água. Finalmente, a

amostra é analisada por cromatografia gasosa.

2.4. Técnicas de análise multirresíduo

A determinação de pesticidas é um grande desafio considerando as baixas concentrações destes analitos presentes nos alimentos, as diferentes propriedades físicas e químicas, bem como a presença de altas concentrações de compostos interferentes (BIZIUK *et al.*, 1996). Mesmo assim, milhares de análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos são realizadas em todo o mundo, todos os dias, com o objetivo de garantir a saúde da população e também garantir que o respectivo alimento atenda às exigências da legislação. As técnicas analíticas permitem a quantificação dos resíduos em baixos níveis de concentração, fornecendo, muitas vezes, evidências para confirmar a identificação e a concentração dos resíduos detectados (MARTEL, 2008).

Várias metodologias utilizadas para a determinação de resíduos de agrotóxicos são baseadas em técnicas de cromatografia em fase gasosa (CG) ou em fase líquida (CL) (LIMA *et al.*, 2001; GOULART *et al.*, 2010). Estas técnicas são muito importantes na análise química em função de sua facilidade em efetuar as separações, identificar e quantificar as espécies presentes na amostra, fornecendo excelentes resultados com limites de detecção na faixa de nanogramas a microgramas/L (ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$), dependendo do detector utilizado e da técnica de extração (GALLI *et al.*, 2006).

Os agrotóxicos são agrupados por técnicas de análise e detecção sendo os organoclorados normalmente analisados por cromatografia gasosa e detector por captura de elétrons (GC-ECD) (SUCHAN *et al.*, 2004; RISSATO *et al.*, 2005; FENOLL *et al.*, 2007b; BALINOVA *et al.*, 2007; GOULART *et al.*, 2008; PINHO *et al.*, 2010), os organofosforados e nitrogenados por cromatografia gasosa com detector fotométrico de chama (GC-FPD) (AHMADI *et al.*, 2006; LAMBROPOULOU e ALBANIS, 2002) ou nitrogênio-fósforo (NPD) (FENOLL *et al.*, 2007a; AMVRAZI e TSIROPOULOS, 2009) e para os carbamatos o uso de HPLC com detector no UV/Vis (RIVAS *et al.*, 2006; GOULART *et al.*, 2010) ou fluorescência (NEDELKOSKA e LOW, 2004) (RIAL-OTERO *et al.*, 2007). Estas técnicas também podem ser utilizadas em conjunto

com outras, como as espectroscópicas (JIANG *et al.*, 2005) e eletroanalíticas (PATERSON *et al.*, 1996; GALLI *et al.*, 2006).

O detector por captura de elétrons (DCE) possui a vantagem de ser um dos mais sensíveis entre todos os detectores, sendo possível com a sua utilização a detecção de 10^{-12} a 10^{-14} g de espécies eletroafins (COLLINS, 2006).

2.5. Efeito de matriz

O efeito de matriz é observado quando uma considerável diferença de resposta é obtida entre padrões preparados no solvente e aqueles preparados no extrato da matriz, com boa precisão (PICÓ *et al.*, 2004).

Os primeiros trabalhos sobre a influência da matriz nas análises de agrotóxicos por cromatografia foram publicados a partir de 1981 (PINHO *et al.*, 2009). No entanto, considera-se que o efeito de matriz foi sistematicamente estudado pela primeira vez por ERNEY *et al.*, 1993 na análise de organofosforados em leite e manteiga por CG.

A matriz pode exercer efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal) sobre o resultado da análise. Quando o resultado for acima de 10% considera-se que o efeito de matriz começa a exercer influência nas análises (ZROSTLIKOVA e HAJŠLOVÁ, 2003). Este efeito é mais pronunciado em análises de amostras complexas, como frutas, vegetais, mel, sucos, vinhos, óleo de oliva, tecidos animais, leite humano, solos, etc (PINHO *et al.*, 2009).

O efeito de matriz pode ocorrer em diversas partes do sistema cromatográfico como: injetor, coluna ou detector. No injetor, as interações entre analitos e os sítios ativos do *liner* (insetor) são as principais responsáveis pelo efeito de matriz nas análises cromatográficas. O *liner* (insetor) situado na porta de injeção é um tubo de vidro, contendo grupos silanois em sua estrutura. Esses grupos silanois são os sítios ativos que podem induzir a degradação ou simplesmente adsorver o composto de interesse (ZROSTLIKOVA e HAJŠLOVÁ, 2003).

Uma das maneiras de minimizar e/ou eliminar este efeito é reduzir a quantidade de componentes da matriz que co-eluem com os analitos no

detector, para isto, métodos de extração mais seletivos e etapas mais eficientes de clean-up devem ser desenvolvidos (PICÓ *et al.*, 2004).

Entre as diversas maneiras utilizadas para compensar o efeito de matriz em CG, podemos citar: 1) uso do método da adição padrão; 2) uso de padrão interno deuterado; 3) preparo das soluções analíticas no extrato da matriz, entre outras alternativas (PICÓ *et al.*, 2004).

O efeito de matriz pode ser calculado conforme a Equação 1. Desta forma, as áreas obtidas das soluções analíticas preparadas em solvente e no extrato da matriz são comparadas (FRIGGI, 2008).

$$\text{Efeito de matriz (\%)} = \frac{(X_1 - X_2)}{X_2} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

onde:

X_1 = média das áreas da solução analítica de cada agrotóxico, preparada em extrato da matriz, numa dada concentração;

X_2 = média das áreas da solução analítica de cada agrotóxico, preparada em solvente, numa dada concentração.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

- Identificar e quantificar resíduos dos agrotóxicos clorotalonil, parationa-metífica, clorpirifós, tiametoxam, procimidona, endossulfam, iprodiona, lambda-cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina em amostras de alface, por cromatografia gasosa.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar as condições cromatográficas ideais para separação dos princípios ativos;
- Adaptar a técnica ESL-PBT para determinação dos agrotóxicos em alface;
- Otimizar e validar a técnica ESL-PBT para análise dos agrotóxicos em alface;
- Avaliar a estabilidade dos analitos em solvente e no extrato da matriz;
- Aplicar a técnica otimizada e validada para:
 - ✓ Monitorar resíduos de alguns princípios ativos em estudo em amostras de alface que receberam doses recomendadas pelo fabricante.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparo de soluções-padrão

Soluções-padrão estoque de cada agrotóxico, na concentração de 1000,0 mg L⁻¹, foram preparadas pela solubilização de padrões de clorotalonil (99,3% m/m), tiametoxam (99,7% m/m), procimidona (99,9% m/m), iprodiona (99,3% m/m), deltametrina (99,7% m/m), permetrina (92,2% m/m) adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), parationa-metílica (99,0% m/m), clorpirifós (99,0% m/m), endossulfam (73,2% m/m), cipermetrina (92,4% m/m) adquiridos da Chem Service (West Chester, PA, USA) e λ-cialotrina (86,5% m/m) adquirida da Syngenta (São Paulo, Brasil), em acetonitrila da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) grau HPLC. A solução de trabalho contendo os agrotóxicos clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, procimidona, endossulfam, cipermetrina na concentração de 10,0 mg L⁻¹, tiametoxam na concentração de 50,0 mg L⁻¹ e permetrina e deltametrina na concentração de 20,0 mg L⁻¹, foi preparada a partir da diluição das soluções-padrão estoque, com o mesmo solvente.

A solução-padrão estoque do padrão interno, na concentração de 1000,0 mg L⁻¹, foi preparada pela solubilização do padrão de bifentrina (92,2 % m/m), obtida da FMC (Brasil) em acetonitrila. A partir da diluição da solução-padrão estoque foi preparada uma solução de trabalho na concentração 10,0 mg L⁻¹, com o mesmo solvente.

Estas soluções foram armazenadas em geladeira à temperatura de aproximadamente 4 °C.

4.2. Análise cromatográfica

As análises qualitativas e quantitativas dos princípios ativos estudados foram realizadas em um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-2014, com detector por captura de elétrons (DCE), equipado com auto-injetor AOC-20i.

As condições analíticas otimizadas para as análises, tais como: programação de aquecimento da coluna cromatográfica, temperaturas do injetor e do detector, modo de injeção, e vazão do gás de arraste, foram determinadas visando um pequeno tempo de análise, uma boa resolução e separação dos picos dos agrotóxicos de interesse.

A seguir encontram-se descritas as condições ideais determinadas:

- Coluna capilar DB-5 da Agilent Technologies, com fase estacionária composta de 5 % de fenil e 95 % de dimetilsiloxano, 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,10 μm de espessura de filme.
- Programação de aquecimento da coluna:
150 °C (2 min) $\xrightarrow{40\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}}$ 210 °C (2 min) $\xrightarrow{20\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}}$ 240 °C (5 min) $\xrightarrow{15\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}}$ 290 °C (5 min)
- Tempo total de análise: 20,33 minutos
- Temperatura do injetor: 280 °C
- Temperatura do detector: 300 °C
- Volume injetado: 1,0 μL
- Divisão de fluxo: 1:5
- Gás de arraste: nitrogênio
- Vazão do gás de arraste: 1,2 mL min^{-1}

4.3. Amostras de alface

Para a realização da otimização e validação da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura foi utilizada alface orgânica do tipo lisa, proveniente do laboratório Clínica de Doenças de Plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa-UFV.

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

4.4.1. Preparo e fortificação das amostras de alface

A alface foi picada e triturada em um mixer da marca Philips WALITA até total homogeneização obtendo-se a polpa de alface. Em seguida, em frascos de vidro transparente com capacidade de 22,0 mL, foram adicionados 4,0000 g de polpa de alface, medida em balança analítica (Sartorius BP 2215), com precisão de 1×10^{-4} g, sendo esta fortificada com 80,0 μ L da solução de trabalho contendo os onze agrotóxicos. As amostras fortificadas com 0,20 μ g g⁻¹ de clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, procimidona, endossulfam, cipermetrina, 1,00 μ g g⁻¹ de tiametoxam e 0,40 μ g g⁻¹ de permetrina e de deltametrina, foram deixadas em repouso por aproximadamente 3 horas em recipiente aberto, para que houvesse maior interação dos agrotóxicos com a amostra e para a evaporação do solvente. Posteriormente, estas amostras foram submetidas aos procedimentos de extração.

4.4.2. Extração dos agrotóxicos em alface

Aos frascos de vidro transparente contendo amostras de alface trituradas e fortificadas, foi adicionado a mistura extratora, constituída de 0,5 mL de água e 8 mL de solvente orgânico (6,5 mL de acetonitrila: Vetec grau HPLC – Rio de Janeiro, Brasil + 1,5 mL de acetato de etila: Vetec – Rio de Janeiro, Brasil). Após 10 minutos de agitação mecânica em mesa agitadora a 25 °C e 200 oscilações por minuto, a mistura foi resfriada em freezer a -20 °C \pm 5 °C, por aproximadamente 12 horas. Após a separação das fases pelo congelamento da polpa de alface juntamente com a fase aquosa, o líquido sobrenadante foi passado por um papel de filtro contendo 1,5000 g de sulfato de sódio anidro (99,0% m/m) da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), para eliminar possível presença de água. Do extrato coletado, retirou-se 1,5 mL e colocou-se direto no “vial”. As amostras foram armazenadas no freezer, até o momento da análise.

Os extratos foram analisados por CG-DCE nas condições analíticas previamente estabelecidas.

4.5. Otimização da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura

A otimização da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura para análise dos agrotóxicos clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, tiametoxam, procimidona, endossulfam, iprodiona, λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina em amostras de alface foi adaptada das técnicas para extração de piretróides em leite (GOULART *et al.*, 2008) e para extração de clorpirifós, cipermetrina, λ -cialotrina e deltametrina em tomate (PINHO *et al.*, 2010).

Optou-se em trabalhar com o método da otimização univariada, em que um único fator é alterado e analisado separadamente em cada experimento, enquanto os demais permanecem constantes.

No processo de otimização desta técnica alguns parâmetros importantes foram avaliados a fim de se obter os melhores rendimentos com menor tempo de análise e baixo custo.

Os parâmetros avaliados para otimizar a técnica ESL-PBT em amostras de alface, foram : adição de água, solventes extratores, modo e tempo de agitação, efeito do pH, força iônica, tempo de congelamento, tempo de centrifugação e volume de mistura extratora e massa de amostra.

4.5.1. Adição de água

Avaliou-se a quantidade de água adicionada à mistura extratora. Os volumes de água adicionados a 4,0000 g de amostra fortificada (item 4.4.1.) e a 8,00 mL de mistura extratora foram: 4,00; 2,00; 1,00; 0,50 mL e sem água. Em seguida, a técnica ESL-PBT foi utilizada como descrito no item 4.4.2.

4.5.2. Solventes extratores

Outro parâmetro que também foi avaliado na otimização da ESL-PBT para a extração dos agrotóxicos em amostra de alface foi o solvente extrator.

As amostras foram preparadas conforme procedimento descrito no item 4.4.1. e 4.4.2. utilizando o parâmetro otimizado no item anterior .

Foram testados acetonitrila (8,0 mL), e a mistura acetonitrila: acetato de etila (6,5:1,5 v/v), como solventes extratores.

As respostas utilizadas para avaliar o melhor solvente extrator foram as porcentagens de recuperação médias obtidas para cada um dos agrotóxicos após os ensaios de extração realizados em triplicata com os diferentes solventes extratores.

4.5.3. Modo e tempo de agitação

A Tabela 5 apresenta os modos e os tempos de agitação avaliados no procedimento descrito nos itens 4.4.1. e 4.4.2 utilizando os parâmetros otimizados nos itens anteriores que proporcionaram melhores resultados.

Tabela 5. Modo e tempo de agitação da mistura amostra: solução extratora.

Modo de agitação	Tempo de agitação (min)
Agitação mecânica (Tenal TE 420)	10
Agitação mecânica (Tenal TE 420)	20
Ultra-som (Unique, Maxi Clean 750)	1
Ultra-som (Unique, Maxi Clean 750)	10
Vórtex (Certomat MV)	0,5
Vórtex (Certomat MV)	1

A agitação mecânica foi em mesa agitadora a 20 °C e 200 oscilações por minuto.

4.5.4. Efeito do pH

Avaliou-se também o efeito da alteração do pH da amostra na eficiência de extração dos analitos. O estudo foi realizado de acordo com a metodologia proposta nos itens 4.4.1 e 4.4.2. utilizando-se os parâmetros otimizados nos itens anteriores. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os valores de pH avaliados foram 2,44; 6,01 e 12,08. Utilizou-se peagâmetro Digimed DM 21, para aferir os valores de pH.

A avaliação desse parâmetro foi realizada substituindo o volume de água adicionada à amostra por soluções de HCl (Vetec, Brasil) ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e NaOH (Vetec, Brasil) ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$).

É importante ressaltar que a partir da otimização desse parâmetro, foi adicionado à metodologia proposta nos itens 4.4.1. e 4.4.2. a centrifugação (3 minutos a 3000 rpm) após a homogeneização da amostra com a mistura extratora. A centrífuga utilizada foi da marca FANEM – Excelsa II, modelo 206 MP.

4.5.5. Força iônica

A influência da força iônica na eficiência de extração dos analitos em amostras de alface foi avaliada através da substituição da água adicionada à amostra por solução de cloreto de sódio (Isofar – 99% m/m) na concentração de 2% (m/v), aumentando-se assim a força iônica do meio. Utilizou-se a metodologia proposta nos itens 4.4.1. e 4.4.2 com a modificação proposta no item 4.4.4. e utilizando os parâmetros já otimizados nos itens anteriores. Foram avaliadas as amostras com e sem a adição de sal.

4.5.6. Tempo de congelamento

O tempo em que as amostras de alface permaneceram no freezer (Consul 280) após a extração proposta no item 4.4.2 usando os parâmetros otimizados nos itens anteriores, foi avaliado. Avaliaram-se os tempos de 3; 6; 12 e 24 horas.

4.5.7. Tempo de centrifugação

Foi avaliado também o parâmetro tempo de centrifugação. Para fazer essa avaliação utilizou-se a metodologia proposta nos itens 4.4.1. e 4.4.2. com

os parâmetros otimizados nos itens anteriores que proporcionaram melhores resultados para eficiência de extração dos onze agrotóxicos estudados. Os tempos de centrifugação testados foram: 1; 3 e 5 minutos a uma rotação de 1200 g.

4.5.8. Volume de mistura extratora e massa de amostra

Foi avaliada também a redução proporcional do volume de mistura extratora e de massa de amostra. A metodologia utilizada foi a descrita nos itens 4.4.1. e 4.4.2 com os parâmetros otimizados nos itens anteriores. Foi feito um ensaio com 2,0000 g de amostra, 0,5 mL de água e 4,0 mL de mistura extratora e outro ensaio com 4,0000 g de amostra, 1,0 mL de água e 8,0 mL de mistura extratora. Compararam-se os resultados de eficiência de extração.

É importante ressaltar que 2,0000 g de amostra foi fortificada com 40 µL de solução de trabalho contendo os onze analitos estudados.

4.6. Eficiência da etapa de *clean-up* dos extratos de alface

Os brancos de extratos orgânicos obtidos da ESL-PBT otimizada para extração de clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, tiametoxam, procimidona, endossulfam, iprodiona, permetrina, cipermetrina e deltametrina em amostras de alface foram submetidos a uma etapa de *clean-up* para melhorar a qualidade dos cromatogramas na análise cromatográfica.

4.6.1. *Clean-up* com os adsorventes florisil e sílica gel

Foram testadas duas etapas com os adsorventes florisil (Sigma-Aldrich, Alemanha) e sílica gel (Merck, Alemanha):

- a) Ao papel de filtro utilizado na etapa de filtração com 1,5000 g de sulfato de sódio anidro (item 4.4.2.), foi adicionado 1,0000 g de adsorvente. O extrato orgânico foi filtrado. Retirou-se 1,5 mL de fase orgânica, colocou-

se direto no “vial”. Os “vials” foram armazenados no freezer até o momento da análise cromatográfica. Os ensaios foram realizados em duplicata.

- b) O branco de extrato orgânico obtido da ESL-PBT otimizada (7,5 mL) foi passado por uma coluna de polietileno contendo 2,0000 g de adsorvente na camada inferior e 1,5000 g de sulfato de sódio anidro na parte superior da coluna, afim de eliminar o excesso de água. Retirou-se 1,5 mL de fase orgânica (eluato), colocou-se direto no “vial”. Os “vials” foram armazenados no freezer até o momento da análise cromatográfica. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.6.2. *Clean-up* com carvão ativado

Esta avaliação foi realizada transferindo-se 4 mL do extrato orgânico resultante da metodologia proposta e otimizada nos itens 4.4.1., 4.4.2. e 4.5. para um frasco de vidro transparente com capacidade de 22,0 mL contendo 0,1000 g de carvão ativado (Labimpex, Brasil). O sistema foi agitado vigorosamente e manualmente por 1 minuto e, logo após, centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. Essa etapa de *clean-up* foi adaptada da técnica proposta por COGO, 2008.

É importante ressaltar que nessa etapa, as amostras foram fortificadas de acordo com o item 4.4.1. com 0,20 $\mu\text{g g}^{-1}$ de clorotalonil, parationa-metilica, clorpirifós, procimidona, endossulfam, cipermetrina, 1,00 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tiametoxam e 0,40 $\mu\text{g g}^{-1}$ de permetrina e de deltametrina.

4.7. Estudo da estabilidade do analito no solvente e no extrato da matriz

4.7.1. Estabilidade do analito no solvente

Para a avaliação da estabilidade do analito no solvente (acetonitrila), foi preparado 10,0 mL de solução a 0,1 mg L^{-1} de clorotalonil, parationa-metilica,

clorpirifós, procimidona, endossulfam, cipermetrina, 0,5 mg L⁻¹ de tiametoxam e 0,2 mg L⁻¹ de permetrina e deltametrina a partir da solução trabalho.

Essa solução foi dividida em três alíquotas. A partir de uma dessas alíquotas, logo após o preparo, retirou-se 1,5 mL colocando direto no “vial” com 15,0 µL de solução de bifentrina a 10,0 mg L⁻¹ para imediata análise cromatográfica.

As demais alíquotas foram rotuladas e acondicionadas à temperatura ambiente exposta à luz e em freezer a -20 °C ± 5 °C.

As análises cromatográficas foram feitas novamente após 1; 2; 3; e 4 semanas de estocagem para cada alíquota. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.7.2. Estabilidade do analito no extrato da matriz

Para a avaliação da estabilidade do analito no extrato da matriz, foram preparados cerca de 50,0 mL de extrato orgânico de acordo com a metodologia proposta nos itens 4.4.1., 4.4.2. e 4.5., sem a fortificação.

Em seguida, 50,0 mL de solução a 0,1 mg L⁻¹ de clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, procimidona, endossulfam, cipermetrina, 0,5 mg L⁻¹ de tiametoxam e 0,2 mg L⁻¹ de permetrina e deltametrina a partir da solução trabalho foi preparada no extrato da matriz.

Essa solução foi dividida em três alíquotas. A partir de uma dessas alíquotas, logo após o preparo, retirou-se 1,5 mL colocando direto no “vial” com 15,0 µL de solução de bifentrina a 10,0 mg L⁻¹ para imediata análise cromatográfica.

As demais alíquotas foram rotuladas e acondicionadas à temperatura ambiente exposta à luz e em freezer a -20 °C ± 5 °C.

As análises cromatográficas foram feitas novamente depois de 1; 2; 3; e 4 semanas de estocagem para cada alíquota. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Nas duas primeiras semanas, foram feitas leituras no espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-1100) das alíquotas durante todos os dias, no mesmo horário. Na terceira e na quarta semana, as leituras foram feitas apenas uma vez por semana.

4.8. Linearidade de resposta do detector

A linearidade de resposta do detector DCE foi verificada pela injeção de soluções-padrão em acetonitrila de concentrações crescentes dos analitos 10,0; 60,0; 110,0; 160,0; 210,0; 260,0; 310,0 e 360,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, procimidona, endossulfam, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina; 20,0; 70,0; 120,0; 170,0; 220,0; 270,0; 320,0; 370,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a iprodiona e a permetrina; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0; 300,0; 350,0; 400,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o tiametoxam.

Após a análise cromatográfica, foram contruídas curvas analíticas, relacionando as áreas com as concentrações dos analitos. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação (r) determinado pela regressão linear, calculados com o auxílio do programa Excel® (Microsoft Office 2007).

4.9. Validação do método analítico

Na etapa de validação do método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura em alface e análise por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos: seletividade; linearidade de resposta do método; limite de detecção e limite de quantificação; exatidão (ensaios de recuperação); precisão (repetitividade e precisão intermediária). Os procedimentos realizados para a validação do método proposto e otimizado, foram baseados em recomendações de PASCHOAL *et al.*, 2008; ICH, 1995; RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA, 2003; INMETRO, 2003 e INMETRO, 2010.

4.9.1. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas dos extratos obtidos após a extração de amostras de alface isenta dos agrotóxicos em estudo com os cromatogramas dos extratos obtidos da matriz fortificada. As amostras foram submetidas ao procedimento de extração otimizado.

4.9.2. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) do método proposto foi determinado considerando o valor igual a três vezes o sinal da linha de base (ruído) obtido pela injeção e análise por CG-DCE do extrato da amostra de alface isenta de agrotóxicos. O limite de quantificação (LQ) foi determinado considerando um sinal dez vezes maior que o sinal do ruído (Figura 10).

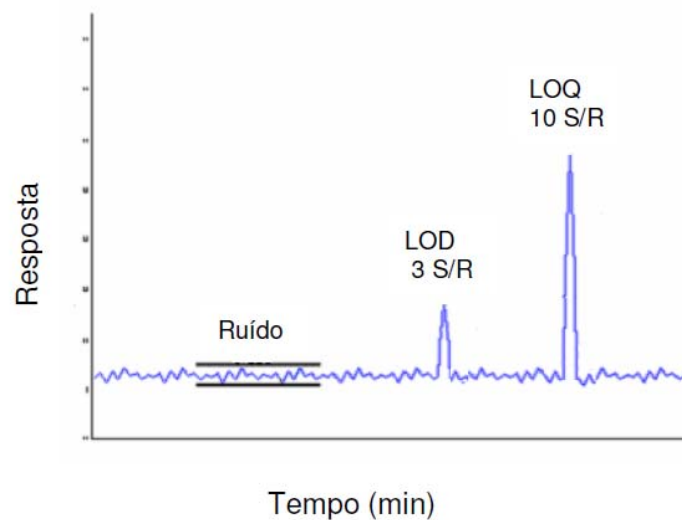


Figura 10. Representação gráfica do estabelecimento dos valores de LD e LQ. (Adaptado de MISTURA, 2003)

Extratos da matriz contaminados pelos agrotóxicos clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, tiametoxam, procimidona, endossulfam, iprodiona, λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina em diferentes concentrações foram injetados até ser observada a relação sinal ruído nas proporções 3:1 e 10:1 para os limites de detecção e quantificação, respectivamente (RIBANI et al., 2004).

4.9.3. Linearidade de resposta do método

A linearidade de resposta do método foi determinada pela injeção de extratos obtidos de amostras fortificadas em 11 concentrações dos princípios ativos clorotalonil (0,6 a 504,6 $\mu\text{g L}^{-1}$); parationa-metílica (49,5 a 654,5 $\mu\text{g L}^{-1}$); clorpirifós e λ -cialotrina (19,8 a 521,8 $\mu\text{g L}^{-1}$); tiametoxam (92,4 a 1098,4 $\mu\text{g L}^{-1}$);

procimidona (13,2 a 515,2 $\mu\text{g L}^{-1}$); endossulfam (0,8 a 504,8 $\mu\text{g L}^{-1}$); iprodiona, cipermetrina e deltametrina (16,5 a 518,5 $\mu\text{g L}^{-1}$); e permetrina (66,0 a 671,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) submetidas à técnica de extração otimizada.

Após a análise cromatográfica dos extratos foram construídas curvas analíticas, relacionando as razões das áreas dos analitos e do padrão interno com as concentrações mencionadas. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação obtido pela regressão linear destas curvas.

4.9.4. Exatidão

Para avaliar a exatidão do método proposto foram realizados ensaios de recuperação.

Nos ensaios de recuperação os agrotóxicos foram adicionados às amostras de alface em concentrações iguais a uma, duas e dez vezes os seus limites de quantificação. Ou seja, as concentrações nessas amostras foram iguais a: 0,6; 1,32 e 6,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o clorotalonil; 49,5; 99,0 e 495,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a parationa-metílica; 19,8; 39,6 e 198,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o clorpirifós e λ -cialotrina 92,4; 184,8 e 924,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o tiametoxam; 13,2; 26,4 e 132,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a procimidona; 0,8; 1,65 e 8,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o endossulfam; 16,5; 33,0 e 165,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a iprodiona, cipermetrina e deltametrina e 66,0; 132,0 e 660,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a permetrina.

4.9.5. Precisão

A precisão do método foi avaliada, por um estudo intralaboratorial, onde se analisaram a repetitividade e a precisão intermediária.

4.9.5.1. Repetitividade

A repetitividade, conforme recomendado pelo INMETRO, foi avaliada pelo preparo, injeção e análise no mesmo dia de sete extratos de amostras de alface fortificadas com os onze agrotóxicos, e submetidas à técnica de extração otimizada, em concentrações iguais a duas vezes o limite de quantificação de

cada agrotóxico. Para tal avaliação, foram determinados os coeficientes de variação (CV) ou desvio padrão relativo referente às porcentagens de recuperação de cada agrotóxico.

4.9.5.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada por meio da porcentagem de recuperação dos agrotóxicos em estudo, e seus respectivos coeficientes de variação, obtidos da análise dos extratos de sete amostras de alface fortificadas com os onze agrotóxicos, e submetidas à técnica de extração otimizada, em concentrações iguais a duas vezes o limite de quantificação de cada um, em três dias diferentes (1º, 3º e 5º dias).

4.10. Avaliação do efeito de matriz

Para verificação do possível efeito da matriz no método proposto nesse trabalho, foram construídas duas curvas analíticas. A primeira curva analítica foi construída com os agrotóxicos clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, tiametoxam, procimidona, endossulfam, iprodiona, λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina em acetonitrila. A outra curva foi construída pela injeção de padrões preparados em extratos orgânicos obtidos de uma matriz, contendo conseqüentemente todos os interferentes e co-extrativos da alface.

As concentrações das soluções padrão preparadas para construção das curvas analíticas foram de 10,0; 60,0; 110,0; 160,0; 210,0; 260,0; 310,0 e 360,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, procimidona, endossulfam, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina; 20,0; 70,0; 120,0; 170,0; 220,0; 270,0; 320,0; 370,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a iprodiona e a permetrina; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0; 300,0; 350,0; 400,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o tiametoxam.

Após a análise das soluções padrão preparadas em acetonitrila e no extrato orgânico por CG-DCE, foram construídas duas curvas analíticas para cada princípio ativo. A porcentagem de efeito de matriz foi calculada a partir da equação 1 (FRIGGI, 2008).

$$\text{Efeito de matriz (\%)} = \frac{(X_1 - X_2)}{X_2} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

onde:

X_1 = média das áreas da solução analítica de cada agrotóxico, preparada em extrato da matriz, numa dada concentração;

X_2 = média das áreas da solução analítica de cada agrotóxico, preparada em solvente, numa dada concentração.

4.11. Aplicação do método

O método desenvolvido e validado foi aplicado no estudo da concentração residual dos agrotóxicos clorotalonil, tiametoxam, procimidona e iprodiona em alface do tipo lisa. O experimento de campo foi conduzido nos meses de outubro e novembro (2010) no Campo Experimental Prof. Diogo Alves de Mello do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa – UFV (Figura 11).



Figura 11. Horta experimental localizada no Campo Experimental Diogo Alves de Mello.

O experimento foi conduzido com a aplicação de 4 produtos constituído de três fungicidas (clorotalonil, procimidona e iprodiona) e um inseticida (tiametoxam), que são autorizados na cultura de alface, com exceção do clorotalonil.

Na Tabela 6 estão descritos os pesticidas utilizados neste estudo bem como a regulamentação de cada produto na Agência Nacional de Vigilância Sanitária, descrevendo a modalidade de aplicação dos produtos, LMR (limite máximo de resíduo) na cultura de alface e o intervalo de segurança para cada agrotóxico.

Tabela 6. Agrotóxicos aplicados em experimento na cultura de alface.

Agrotóxicos aplicados	Modalidade de aplicação	LMR na cultura de alface (mg kg⁻¹)	Intervalo de segurança (dias)
Clorotalonil	Foliar	6,0	10
Tiametoxam	Foliar	0,05	40
Procimidona	Foliar	5,0	3
Iprodiona	Foliar	1,0	14

Fonte: ANVISA, 2011.

Os fungicidas e o inseticida foram aplicados 20 dias após o transplante das mudas de alface. Em cada parcela isolada, foi feita a aplicação dos agrotóxicos na horta experimental na dose recomendada (Tabela 7), para assim poder-se avaliar o efeito e a concentração residual de cada um, sem qualquer interação entre eles.

Tabela 7. Dose aplicada e produto formulado dos agrotóxicos.

Agrotóxicos	Dose aplicada	Produto formulado (Marca Comercial)
Clorotalonil	300 mL/100 L de água	Daconil 500 (Syngenta)
Tiametoxam	200 – 300 g/ha	Actara 250 WG (Syngenta)
Procimidona	100-150 g ou 1,0-1,5 kg/ha	Sialex 500 (Sumitomo Chemical)
Iprodiona	150 g/100 L de água	Rovral (Bayer)

Para cada parcela individual, foi feita a análise de resíduos dos agrotóxicos; para isso foram coletadas duas cabeças de alface de cada parcela e uma testemunha, com as amostragens feitas no 3º e 11º dia após a aplicação para o clorotalonil; 3º, 11º e 15º dia para a iprodiona; 2º e 4º dia para a procimidona; e 3º, 11º, 15º, 20º e 25º dia para o tiametoxam.

As amostras de alface foram coletadas e trituradas em mixer. As polpas foram armazenadas em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise cromatográfica

As condições cromatográficas estabelecidas permitiram separar adequadamente os agrotóxicos clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, tiametoxam, procimidona, endossulfam, iprodiona, λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina. A identificação dos compostos de interesse foi realizada comparando o tempo de retenção (t_R) referente a cada pico na solução-padrão e em extrato da matriz (COLLINS, 2006).

Um cromatograma de uma solução-padrão em acetonitrila contendo os agrotóxicos em estudo analisados nas condições descritas no item 4.2 está representado na Figura 12. O tempo total de análise foi de 20,33 minutos.

O cromatógrafo utilizado nas análises possui uma coluna cromatográfica DB-5, composta de 5% de fenil e 95% de dimetilsiloxano, dando a essa coluna um caráter apolar. Dessa forma, a ordem de eluição dos agrotóxicos em estudo é de acordo com a polaridade da molécula, onde as moléculas mais apolares tendem a ficar mais tempo retidas na coluna e as moléculas polares tendem a chegar ao detector mais rapidamente. Baseando-se nos dados da Tabela 3, onde temos o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) para todos os compostos, podemos perceber que a ordem de eluição é obedecida seguindo não só a ordem de polaridade das moléculas, mas tendo influência também do ponto de ebulição das mesmas. Para os três primeiros compostos que saem da coluna, a ordem de polaridade é obedecida, visto que o clorpirifós possui um K_{ow} muito maior que a parationa metílica, que por sua vez também possui um valor de K_{ow} maior que o do clorotalonil. Segundo esse parâmetro, quanto maior o valor de K_{ow} maior é a tendência do composto em ficar na fase orgânica, ou seja, menor a sua polaridade. Como a coluna cromatográfica

possui características apolares, os compostos com maior valor de K_{ow} terão maior tendência em ficar retidos na coluna. Já o tiametoxam ($t_R = 6,24$) possui um valor de K_{ow} menor que o do clorpirifós, que possui $t_R = 5,99$. O fato do tiametoxam ficar mais tempo retido na coluna pode ser justificado pelo valor do seu ponto de ebulição ($485,8\text{ }^\circ\text{C}$), que é maior que o do clorpirifós ($375,9\text{ }^\circ\text{C}$). A procimidona possui um tempo de retenção próximo ao do tiametoxam. Embora essa molécula possua um ponto de ebulição menor, ela possui um valor de K_{ow} maior, fazendo com que a mesma fique mais tempo retida na coluna do que o tiametoxam. O tempo de retenção do endossulfam pode ser explicado também pela característica apolar da molécula, que possui um elevado valor de K_{ow} . A λ -cialotrina possui um valor de K_{ow} maior que o endossulfam, possuindo assim um tempo de retenção maior, pois, fica mais tempo retida na coluna.

A cipermetrina e a deltametrina são os compostos com maiores pontos de ebulição, e por isso são os últimos a saírem da coluna cromatográfica.

A presença de picos duplos para os piretróides λ -cialotrina, permetrina e deltametrina, e de pico triplo para a cipermetrina, está relacionada com a conversão destes compostos em isômeros durante a injeção de soluções no cromatógrafo a gás (MAŠTOVSKÁ e LEHOTAY, 2004). A quantificação desses compostos foi realizada somando-se a áreas dos picos.

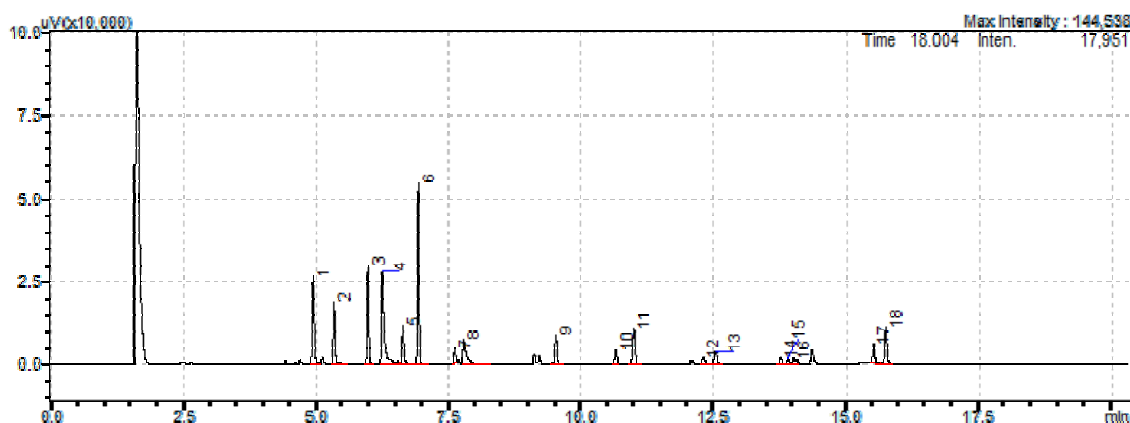


Figura 12. Cromatograma de uma solução-padrão dos agrotóxicos a $0,1\text{ mg L}^{-1}$ para o clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, procimidona, endossulfam e cipermetrina; $0,2\text{ mg L}^{-1}$ para a iprodiona, permetrina e deltametrina; e $0,5\text{ mg L}^{-1}$ para o tiametoxam onde: 1- clorotalonil: $t_R = 4,94$; 2- parationa-metílica: $t_R = 5,35$; 3- clorpirifós: $t_R = 5,99$; 4- tiametoxam: $t_R = 6,24$; 5- procimidona: $t_R = 6,65$; 6- (α) endossulfam: $t_R = 6,92$; 7- (β) endossulfam: $t_R = 7,61$; 8- iprodiona: $t_R = 7,79$; 9- bifentrina (padrão interno): $t_R = 9,51$; 10 e 11- λ -cialotrina: $t_R = 10,66$ e $10,99$; 12 e 13- permetrina: $t_R = 12,30$ e $12,54$; 14, 15 e 16- cipermetrina: $t_R = 13,76$; $13,91$ e $14,00$; e 17 e 18- deltametrina: $t_R = 15,51$ e $15,74$ em acetonitrila.

5.2. Otimização da técnica extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura

A análise de agrotóxicos em amostras como água, solo e alimentos por cromatografia gasosa, requer a extração dos mesmos e muitas vezes a purificação dos extratos. Na extração em fase única, a partição pode ser induzida pelo aumento da força iônica (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; MATKOVICH e CHRISTIAN, 1973) ou pelo abaixamento da temperatura (RIZOS *et al.*, 2001; GOULART *et al.*, 2008; PINHO *et al.*, 2010).

A técnica de extração e partição pelo abaixamento da temperatura consiste em adicionar à amostra contendo os analitos de interesse uma quantidade de solvente orgânico miscível em água, formando uma fase única, para que com o abaixamento da temperatura a aproximadamente -20 °C ocorra a separação das fases, em que a amostra e a água tornam-se sólidas (congeladas) na parte inferior do recipiente utilizado e o solvente contendo os resíduos de agrotóxicos extraídos permaneçam na parte superior.

Dessa forma, devido aos ótimos resultados obtidos pelos pesquisadores que utilizaram a extração em fase única com partição induzida pelo abaixamento da temperatura, foi desenvolvida e otimizada neste trabalho, uma metodologia utilizando a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) para identificar e quantificar onze agrotóxicos em amostras de alface.

Alguns parâmetros como: adição de água, solventes extratores, modo e tempo de agitação, efeito do pH, força iônica, tempo de congelamento, tempo de centrifugação e volume de mistura extratora e massa de amostra, foram avaliados. Os resultados obtidos serão descritos a seguir.

5.2.1. Adição de água

Em 2004, GOULART descreveu o método de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT), para extração e análise de piretróides em leite por cromatografia gasosa. Posteriormente, a técnica foi otimizada e validada por VIEIRA *et al.*, 2007 para extração de 4 piretróides em água. Esta técnica também foi adaptada e otimizada por PINHO *et al.*, 2010

para análise de resíduos de agrotóxicos em tomate onde foi feita uma extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT).

Durante os testes preliminares para a adaptação da técnica ESL-PBT em amostras de alface, observou-se que parte da fase orgânica composta pela mistura extratora estava congelando junto com a fase aquosa e com isso, parte dos analitos poderia ficar retida, diminuindo assim, a disponibilidade dos mesmos na fase líquida.

Dessa forma, com o objetivo de disponibilizar mais fase orgânica após a etapa de congelamento buscando recuperar um maior volume de extrato possível, próximo de 8,0 mL, e conseqüentemente maiores porcentagens de recuperação dos analitos em estudo, a influência da adição de água foi avaliada.

Para a otimização desse parâmetro foi utilizada a mistura extratora otimizada por VIEIRA *et al.*, 2007, onde recomenda-se usar 8,0 mL de mistura extratora contendo acetonitrila e acetato de etila. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 13.

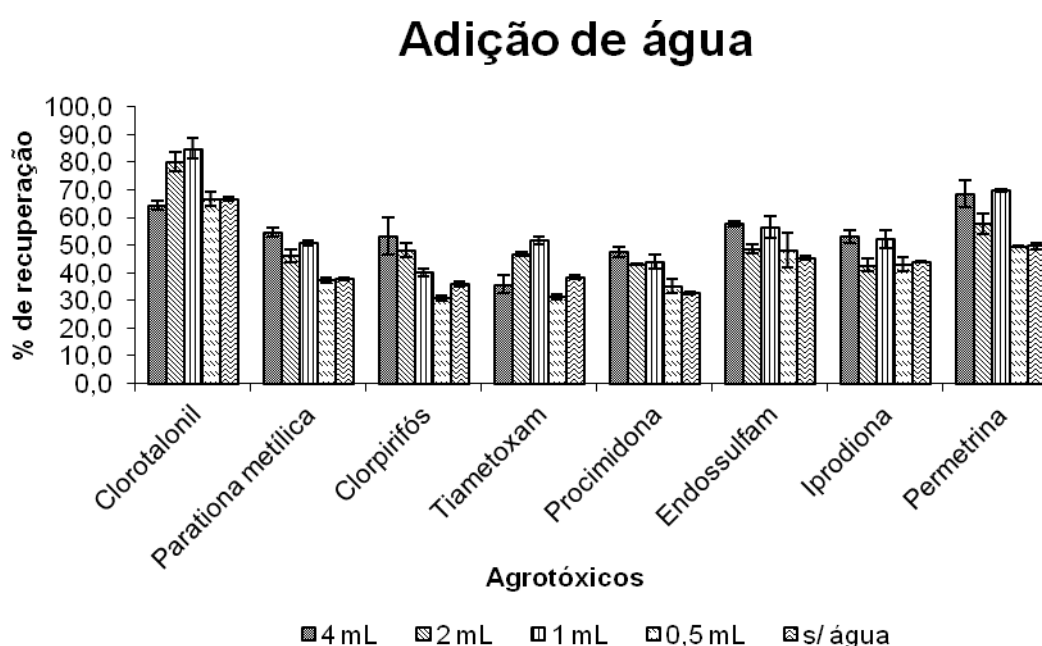


Figura 13. Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em alface em função da quantidade de água.

De acordo com o Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança, os resultados são estatisticamente iguais para a maioria dos agrotóxicos considerando a adição de 4,0 e 1,0 mL de água. Entretanto, como se pode

observar, para os agrotóxicos parationa-metílica, clorpirifós, a adição de 4,0 mL de água proporcionou melhores porcentagens de recuperação. Já para os compostos clorotalonil e tiametoxam 1,0 mL de água foi a quantidade que proporcionou melhores resultados.

Dessa forma, decidiu-se trabalhar com 1,0 mL de água pelo fato de se optar sempre por menores volumes em metodologias de extração. Esse teste foi realizado apenas para o clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, tiametoxam, procimidona, endossulfam, iprodiona e permetrina e o melhor resultado foi aplicado para a λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina. As respostas obtidas para os mesmos foram satisfatórias, permitindo-se assim utilizar 1,0 mL de água.

5.2.2. Solventes extratores

Muitos estudos de análise de resíduos de agrotóxicos têm sido descritos utilizando diferentes solventes ou mistura de solventes na etapa de extração, aplicados em diferentes matrizes.

A acetonitrila, a acetona e o acetato de etila são os três solventes mais comumente usados em métodos multirresíduos para a determinação de agrotóxicos em diversas matrizes (MAŠTOVSKÁ e LEHOTAY, 2004).

Com o objetivo de estudar a influência da polaridade do solvente extrator na porcentagem de recuperação dos agrotóxicos em amostras de alface utilizou-se como solventes extratores a acetonitrila e uma mistura de acetonitrila: acetato de etila (6,5:1,5, v/v). A adição de acetato de etila diminui a polaridade do solvente extrator, favorecendo a extração dos agrotóxicos menos polares. Entretanto, o volume máximo de acetato de etila que pode ser adicionado à mistura é de 1,5 mL, para não romper o equilíbrio da fase única (VIEIRA *et al.*, 2007). Dessa forma, o volume máximo de acetato de etila adicionado à mistura extratora foi de 1,5 mL.

Os resultados obtidos pela avaliação dos solventes extratores testados são apresentados na Figura 14.

Solventes extratores

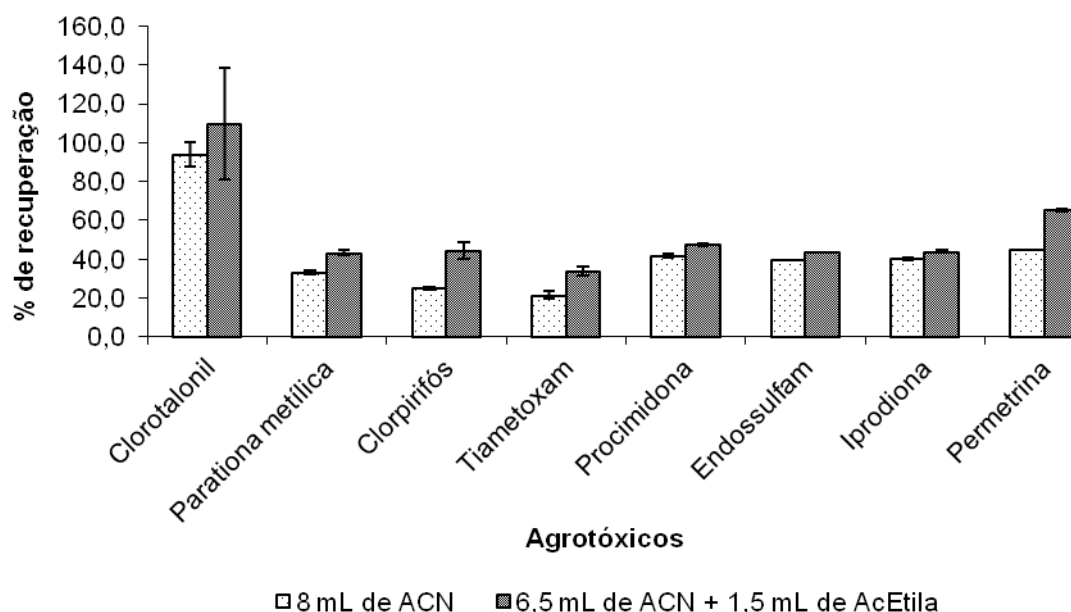


Figura 14. Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em alface utilizando acetoneitrila (ACN) e a mistura acetoneitrila: acetato de etila (AcEtila) como solventes extratores.

De acordo com os resultados obtidos, optou-se em trabalhar com o solvente extrator composto pela mistura acetoneitrila: acetato de etila (6,5:1,5, v/v) por proporcionar melhores porcentagens de recuperação para todos os agrotóxicos em estudo. Somente para o clorotalonil que os valores de porcentagem de recuperação foram estatisticamente iguais de acordo com o Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança. Esse teste foi realizado apenas para o clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, tiametoxam, procimidona, endossulfam, iprodiona e permetrina e o melhor resultado foi aplicado para a λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina. As respostas obtidas para os mesmos foram satisfatórias, permitindo-se assim utilizar a mistura acetoneitrila: acetato de etila como solvente extrator.

Os melhores resultados para a mistura acetoneitrila: acetato de etila podem ser justificados pelo fato dos agrotóxicos em estudo terem características pouco polares, logo, a mistura menos polar favorece a extração dos mesmos.

Resultados semelhantes a estes foram obtidos por PINHO *et al.*, 2010 e por COSTA, 2010, onde foi observado que a mistura menos polar proporcionou

melhores porcentagens de recuperação de agrotóxicos em tomate e abacaxi, respectivamente. Já FENOLL *et al.*, 2007b, para a extração de 19 pesticidas em amostras de alface de diferentes variedades utilizou acetona e a mistura acetato de etila: ciclohexano (1:1, v/v).

5.2.3. Modo e tempo de agitação

A etapa de agitação das amostras ou homogeneização é um dos fatores mais relevantes no processo de otimização de uma técnica, pois é nessa etapa que ocorre maior interação dos solventes extratores com os analitos que estão sendo extraídos.

Dessa forma, para avaliar se o modo e o tempo de agitação influenciariam na porcentagem de recuperação dos analitos em estudo, foram testados os tempos e os modos de agitação descritos no item 4.5.3. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 15.

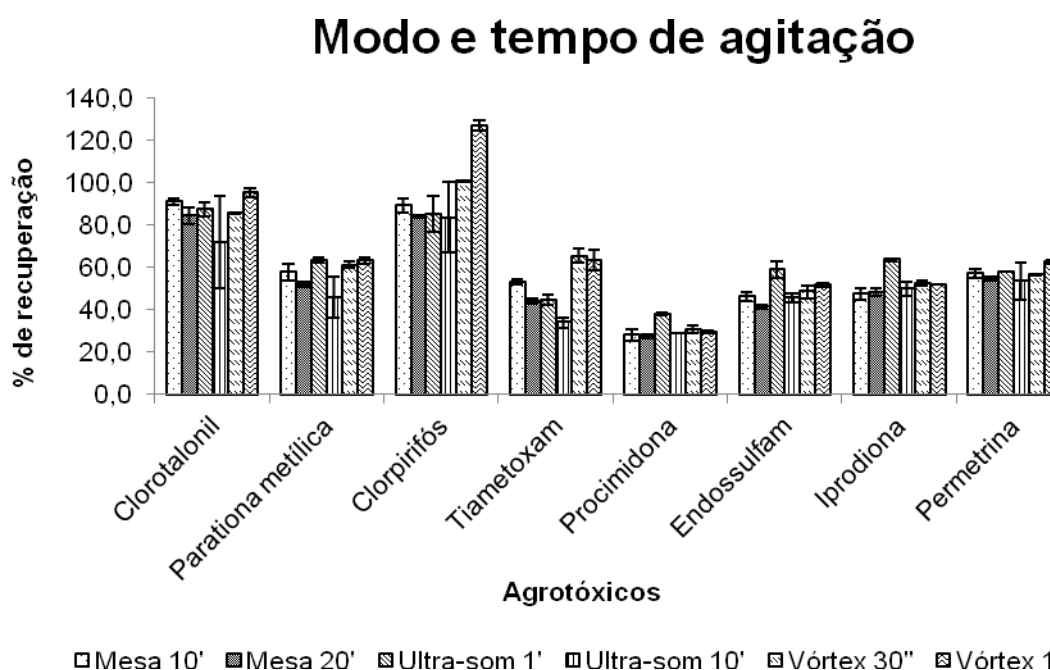


Figura 15. Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em alface em função do modo e tempo de agitação.

Pelos resultados obtidos, percebe-se que a agitação em ultra-som por 10 minutos forneceu as menores respostas com maiores desvios-padrão para a maioria dos agrotóxicos em estudo.

Já a agitação em vórtex 0,5 e 1 minuto, para a maioria dos agrotóxicos, os valores de porcentagem de recuperação foram estatisticamente iguais ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Tukey e quando diferiram, para o clorpirifós, o tempo de 1 minuto proporcionou melhor porcentagem de recuperação.

A agitação mecânica nos tempos de 10 e 20 minutos também não apresentou diferenças significativas ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Tukey e quando diferiu, para o tiametoxam e endossulfam, o tempo de 10 minutos proporcionou melhor porcentagem de recuperação.

Assim, comparando os resultados obtidos com a agitação mecânica por 10 minutos com os da agitação em vórtex por 1 minuto, percebe-se que para muitos agrotóxicos não existe diferença significativa ao nível de 95% de confiança pelo Teste Tukey.

Portanto, optou-se por trabalhar com agitação mecânica por 10 minutos, tendo em vista as boas porcentagens de recuperação obtidas, desvios-padrão baixos e uma maior facilidade de operação o que torna o trabalho menos laborioso pois, existe a possibilidade de se agitar 20 amostras ao mesmo tempo sem necessidade da participação do analista como é o caso do vórtex, por exemplo. Este teste foi realizado apenas para o clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, tiametoxam, procimidona, endossulfam, iprodiona e permetrina e o melhor resultado foi aplicado para a λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina. As respostas obtidas para os mesmos foram satisfatórias, permitindo-se assim utilizar a agitação mecânica por 10 minutos.

5.2.4. Efeito do pH

Este estudo buscou avaliar o efeito do pH da amostra na eficiência da extração dos analitos em estudo. A mudança do pH da amostra mudará a forma ionizada ou não-ionizada de certos analitos e isto poderá afetar sua solubilidade e eficiência de extração (LAMBROPOULOU e ALBANIS, 2002).

Em geral, os agrotóxicos são estáveis em meio ácido, porém alguns compostos apresentam baixos percentuais de recuperação quando em pH baixo, devido ao fato de estarem protonados e solubilizados na fase aquosa, não sendo recuperados na etapa de partição (PRESTES *et al.*, 2009).

Mastvoska e Lehotay mostraram que a adição de 0,1% (v/v) de ácido acético (HAc) em acetonitrila aumenta a estabilidade de pesticidas antes da análise. Entretanto, não observaram aumento significativo dos percentuais de recuperação obtidos através da extração de uma mistura de matrizes de pêssigo, ameixa, pepino e pimenta verde utilizando método QuEChERS original sem adição de ácido acético e com adição de 0,1; 0,5 e 1,0% (v/v) de ácido acético em acetonitrila (MAŠTOVSKÁ e LEHOTAY, 2004).

O pH é importante tanto para compostos sensíveis à degradação em meio alcalino, como para aqueles sensíveis em meio ácido (PRESTES *et al.*, 2009).

Dessa forma, avaliou-se o efeito do pH da amostra de alface sem ajuste de pH (pH 6,0), em pH 2,5 (ajuste com solução de HCl 0,5 mol L⁻¹) e em pH 12,0 (ajuste com solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹). Os resultados são apresentados na Figura 16.

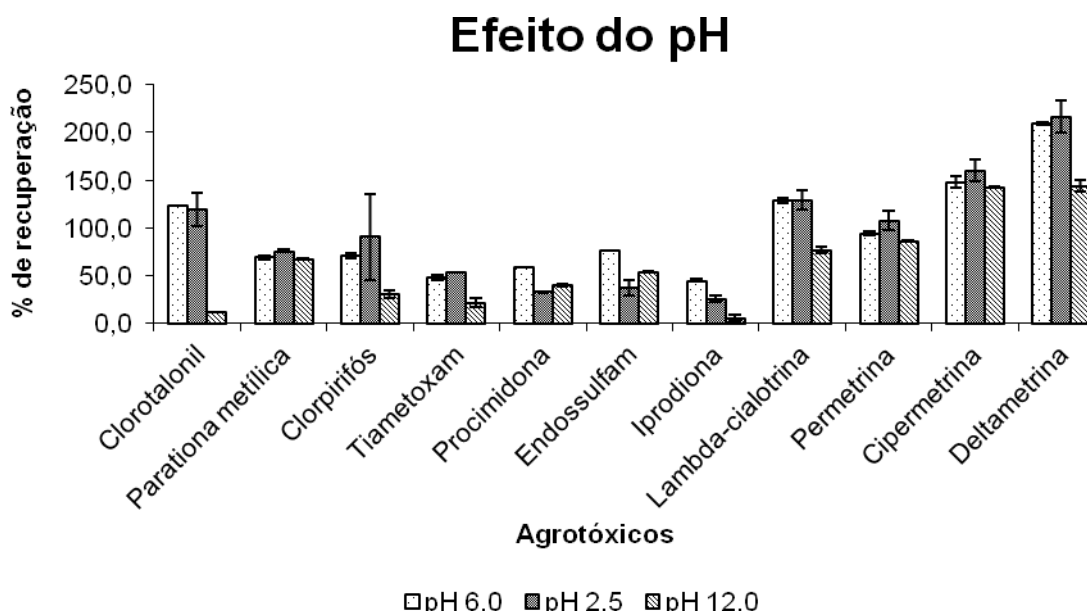


Figura 16. Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em alface em função do pH da amostra.

Para muitos agrotóxicos estudados, como clorotalonil, clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, uma variação do pH da amostra (pH 6,0 para pH 2,5) não afetou de forma significativa as porcentagens de recuperação, de acordo com o Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança, fato também observado por MAŠTOVSKÁ e LEHOTAY, 2004.

Alguns agrotóxicos como, parationa-metilica, tiametoxam e permetrina, tiveram influência positiva na eficiência da extração em pH 2,5, mas os cromatogramas obtidos em meio ácido, apresentaram linha de base mais alta do que em pH 6,0 e pH 12,0 comprometendo assim, a precisão e exatidão das respostas, levando à incerteza dos resultados.

Já em pH 12,0, para muitos agrotóxicos, houve diminuição significativa na eficiência de extração e quando isso não ocorreu, não influenciou de forma positiva nas porcentagens de recuperação.

O efeito do meio básico nos agrotóxicos clorotalonil e iprodiona merece destaque. Houve uma diminuição brusca na eficiência de extração destes. De acordo com LEHOTAY *et al.*, 2005, o clorotalonil sofre degradação em meio básico convertendo-se em 4-hidroxi-2,5,6-tricloroisoftalonitrila. A iprodiona também se comportou como um composto instável em meio básico.

Dessa forma, optou-se em trabalhar em pH 6,0, que é o pH da amostra, que proporcionou porcentagens de recuperação bem aceitáveis além de ser um pH próximo ao recomendado por LEHOTAY *et al.*, 2005, o qual relata que a faixa de pH entre 4 e 5 é uma faixa ideal por proporcionar boas recuperações (> 70%) para agrotóxicos instáveis em meio ácido, além de garantir estabilidade para aqueles agrotóxicos instáveis em meio alcalino.

5.2.5. Força iônica

De acordo com HERCEGOVÁ *et al.*, 2007, os métodos de extração líquido-líquido utilizando acetonitrila, seguido de adição de sal à fase aquosa, permitem uma separação eficiente do sistema homogêneo (fase única) levando a um aumento das porcentagens de recuperação de compostos polares. O aumento da força iônica provoca uma redução da solubilidade do analito na matriz, facilitando a sua extração pela fase orgânica.

Em contrapartida, o aumento considerável da força iônica pode romper o equilíbrio da fase única na ESL-PBT, antes do congelamento da amostra. Esse fenômeno é chamado de *salting-out*. Assim, para manter as características do solvente extrator e avaliar o efeito da força iônica, o volume de água (1,0 mL) foi substituído por uma solução de NaCl 2% m/v. Os resultados são apresentados na Figura 17.

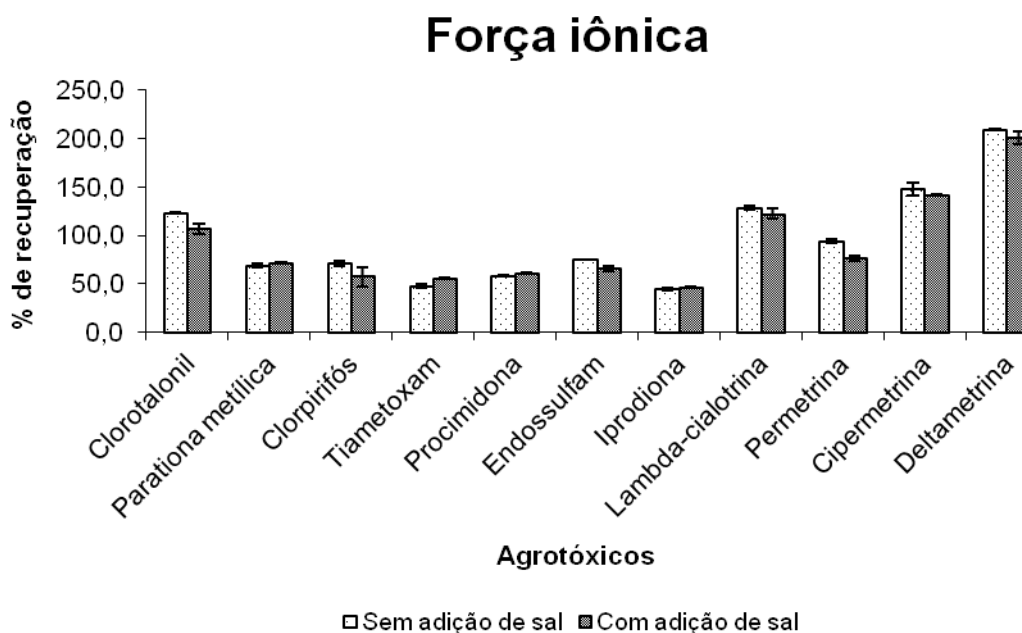


Figura 17. Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em alface em função da força iônica da amostra.

Pelos resultados obtidos, observa-se que para a maioria dos compostos, a adição de sal não influenciou de maneira positiva ou não modificou significativamente ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Tukey a eficiência de extração dos agrotóxicos. Este fato é justificado pela baixa solubilidade dos mesmos em água.

Vale ressaltar que o comportamento do tiametoxam foi diferente em relação aos outros agrotóxicos. Ele foi o único composto que a adição de sal favoreceu de forma positiva a eficiência de extração. O tiametoxam é o composto mais solúvel em água (4100 mg L^{-1} - IUPAC, 2011). A adição de sal (solução de NaCl) provocou a solvatação dos íons pelas moléculas de água, facilitando a migração do mesmo para a fase orgânica.

Mas, mesmo assim, optou-se em trabalhar sem adição de sal, por proporcionar porcentagens de recuperação consideráveis para a maioria dos compostos em estudo.

5.2.6. Tempo de congelamento

A separação das fases pelo abaixamento da temperatura ocorre em virtude da diminuição da solubilidade dos solventes orgânicos em meio aquoso quando ocorre o resfriamento. De acordo com ALVES, 2010, a separação de fases entre o solvente orgânico e a água (fase aquosa+amostra) ocorre 30 minutos após a mistura ser colocada no freezer a uma temperatura de cerca de -20 °C. Mas, como a técnica utilizada neste trabalho é a cromatografia gasosa, é necessário o congelamento da fase aquosa para diminuir ainda mais a possibilidade da presença de água no extrato orgânico.

Empregando testes prévios, foi verificado que o congelamento da fase aquosa ocorreu entre 2-3 horas a uma temperatura de cerca de -20 °C. Desta forma, procurou-se avaliar a eficiência de extração dos analitos em função do tempo de congelamento. Os resultados obtidos para este estudo estão apresentados na Figura 18.

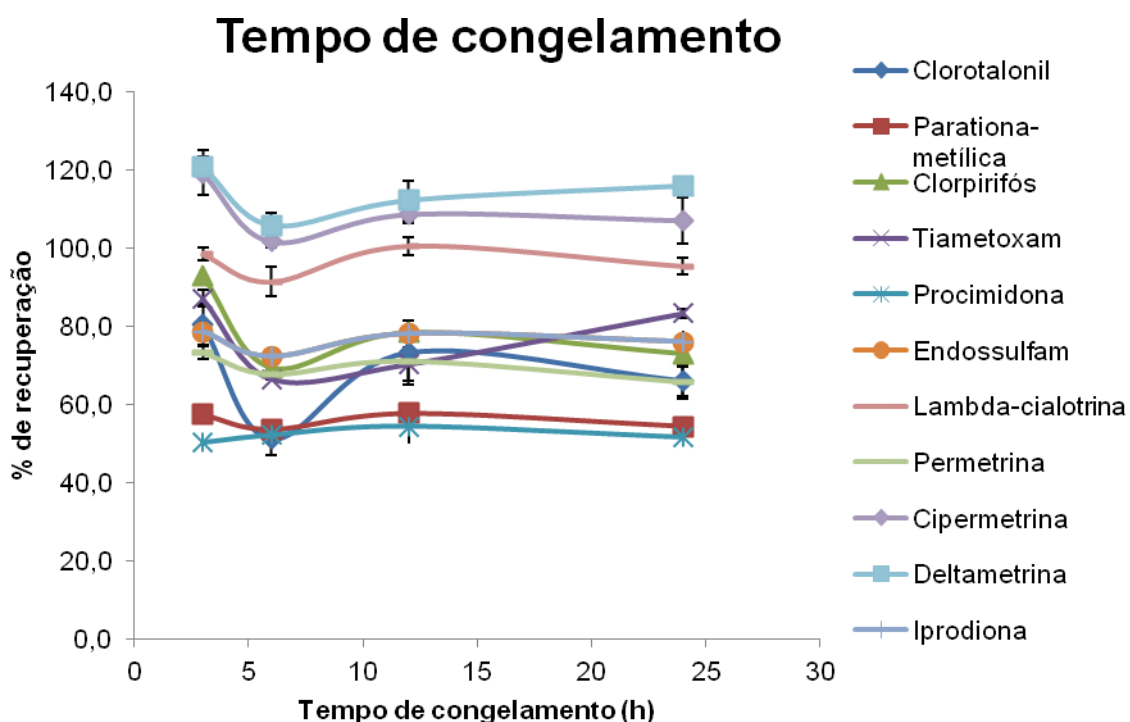


Figura 18. Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em alface em função do tempo de congelamento.

Como pode ser observado na Figura 28, as melhores porcentagens de recuperação para a maioria dos analitos foram obtidas com 3 horas de congelamento.

Percebe-se uma diminuição da eficiência de extração com 6 horas de congelamento devido, provavelmente, ao congelamento de parte da fase orgânica junto com a fase aquosa retendo assim um pouco dos analitos na interface.

A partir de 12 horas existe uma tendência nos resultados de se manterem constantes, indicando que a partir de 12 horas, o tempo de congelamento não influencia na eficiência de extração.

Dessa forma, optou-se em trabalhar com um tempo de 3 horas de congelamento, pois, obtiveram-se resultados satisfatórios em relação à eficiência de extração para a maioria dos agrotóxicos.

5.2.7. Tempo de centrifugação

A centrifugação foi uma etapa inserida na metodologia ESL-PBT como forma de adaptá-la a amostras de alface. Após a etapa de homogeneização em mesa agitadora por 10 minutos, onde ocorre o maior contato da amostra com o solvente extrator, observava-se que a matriz se dispersava muito no solvente extrator. Isso prejudicava a recuperação de extrato orgânico, pois, parte ficava retida com a matriz no congelamento e dessa forma, o volume de extrato recuperado estava sendo menor em relação ao volume de solvente extrator adicionado.

Com a etapa de centrifugação após a homogeneização, a matriz decanta e um maior volume de extrato orgânico é recuperado.

Logo, foi avaliada a influência do tempo de centrifugação na quantidade de volume recuperado e na eficiência de extração. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 19.

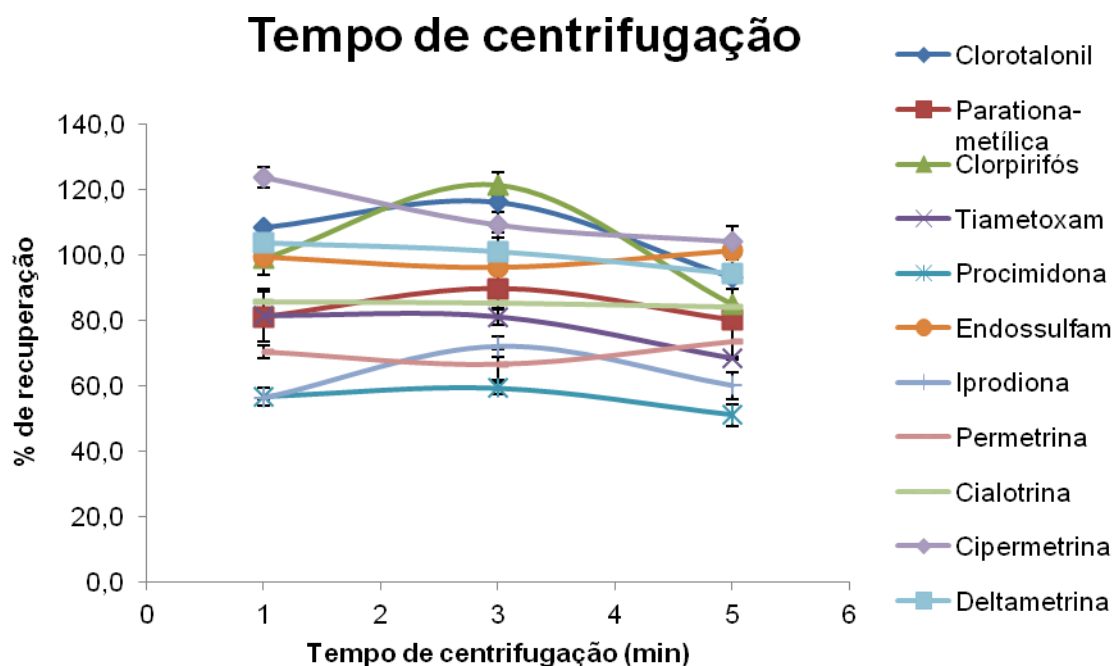


Figura 19. Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em alface em função do tempo de centrifugação.

De acordo com os resultados obtidos, para quatro compostos (endossulfam, λ -cialotrina, permetrina e deltametrina) o tempo de centrifugação

não influenciou na porcentagem de recuperação, ou seja, os valores não diferiram estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Tukey.

Para o restante, com exceção da cipermetrina, o tempo de 3 minutos de centrifugação influenciou de forma positiva na eficiência de extração.

Em relação ao volume de extrato orgânico, recuperaram-se volumes estatisticamente iguais ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Tukey.

Dessa forma, optou-se em trabalhar com o tempo de centrifugação de 3 minutos pelos melhores resultados de porcentagem de recuperação para a maioria dos compostos estudados.

Vale ressaltar que antes de inserir a etapa de centrifugação o volume de extrato recuperado era de aproximadamente 6,5 mL, depois de inserir a centrifugação o volume passou a ser de aproximadamente 7,5 mL.

5.2.8. Volume de mistura extratora e massa de amostra

Com o objetivo de reduzir a quantidade de amostra e solvente orgânico consumidos no preparo de amostras, realizou-se um estudo para ver se a redução de ambos à metade afetaria a eficiência de extração do método. Os resultados para este estudo são apresentados na Figura 20.

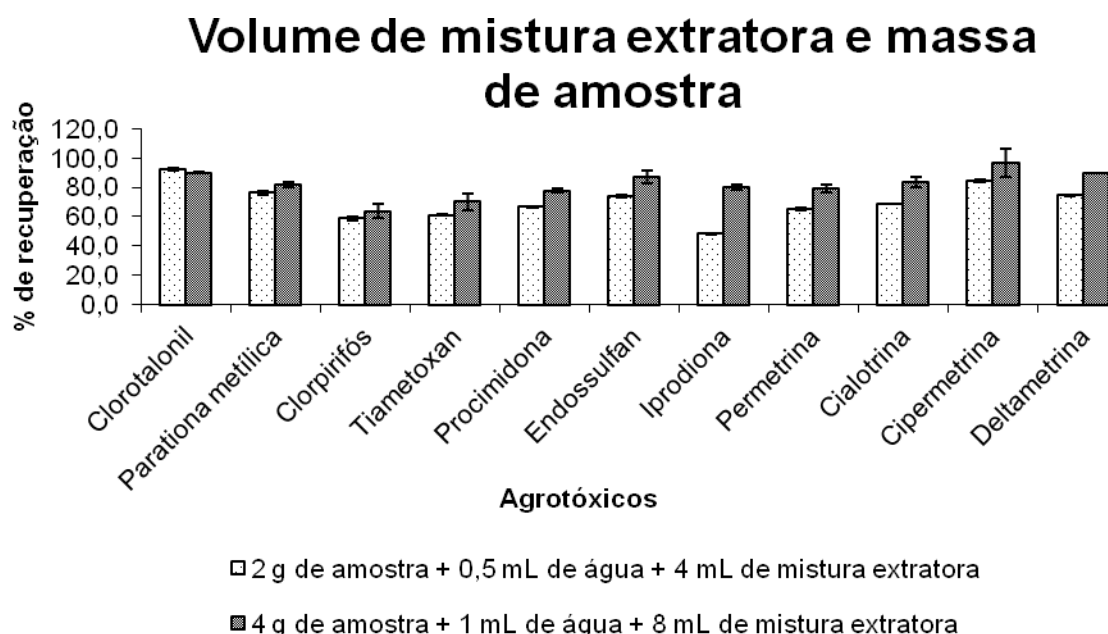


Figura 20. Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em alface variando a massa de amostra e volume de mistura extratora.

Como se pode observar existe diferença significativa ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Tukey para a maioria dos agrotóxicos em relação às percentagens de recuperação ao reduzir o volume de amostra e de mistura extratora. Foram obtidos melhores resultados quando utilizou-se 4,0000 g de amostra + 1,0 mL de água + 8,0 mL de mistura extratora.

Dessa forma optou-se em continuar trabalhando sem a redução do volume de amostra e de mistura extratora.

5.3. Metodologia otimizada

A técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura para extração dos agrotóxicos clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, tiametoxam, procimidona, endossulfam, iprodiona, λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina de amostras de alface foi otimizada.

A metodologia proposta otimizada consiste na extração de 4,0000 g de alface com 6,5 mL de acetonitrila, 1,5 mL acetato de etila e 1,0 mL de água, seguida de agitação em mesa agitadora, a 25 °C e 200 oscilações por 10 minutos.

Posteriormente, a mistura é centrifugada por 3 minutos a 3000 rpm e deixada em freezer a aproximadamente -20 °C por 3 horas. Decorrido o tempo estabelecido, o extrato é passado por um papel de filtro, contendo 1,5000 g de sulfato de sódio anidro. Do extrato recuperado, retira-se 1,5 mL e coloca direto no “vial”. Este é armazenado no freezer, até o momento da análise cromatográfica.

A técnica ESL-PBT otimizada requer consumo de pequeno volume de mistura extratora, evitando-se a necessidade de etapas de evaporação e troca de solvente. Consequentemente reduziram-se os riscos de contaminação e perdas de amostras, favorecendo a obtenção de taxas de recuperação na faixa de 57,0 a 103,0%.

5.4. Eficiência da etapa de *clean-up* dos extratos de alface

O *clean-up* é uma etapa que é realizada para separar satisfatoriamente

os analitos de co-extrativos remanescentes, denominado limpeza dos extratos. Esta etapa representa a alternativa mais recomendada para evitar danos ao sistema cromatográfico (PINHO *et al.*, 2009).

A alface é uma matriz complexa e o seu extrato é pigmentado. Utilizando o detector DCE notou-se a influência de co-extrativos nos cromatogramas, mesmo com resultados satisfatórios no processo de ESL-PBT dos agrotóxicos.

Assim, para melhorar a qualidade dos extratos obtidos por ESL-PBT de amostras de alface, os mesmos foram submetidos à etapa adicional de *clean-up* e os resultados foram avaliados qualitativamente.

5.4.1. *Clean-up* com os adsorventes florissil e sílica gel

Com o objetivo de tornar os extratos mais puros avaliou-se o *clean-up* desses extratos brancos (sem fortificação) pelo uso dos adsorventes florissil e sílica gel na etapa de filtração da fase orgânica após retirar o extrato orgânico da partição em baixa temperatura e em cartuchos de polietileno. Os cromatogramas do branco sem *clean-up*, com florissil na etapa de filtração e com florissil em cartucho estão apresentados na Figura 21.

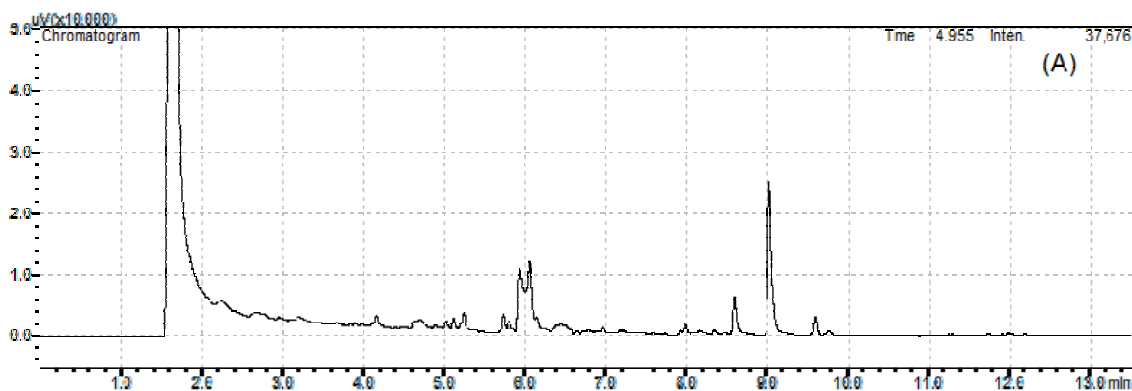


Figura 21. (A) Cromatograma do branco sem *clean-up*; (B) Cromatograma do branco passando pelo florissil na etapa de filtração; (C) Cromatograma do branco passando pelo cartucho com florissil.

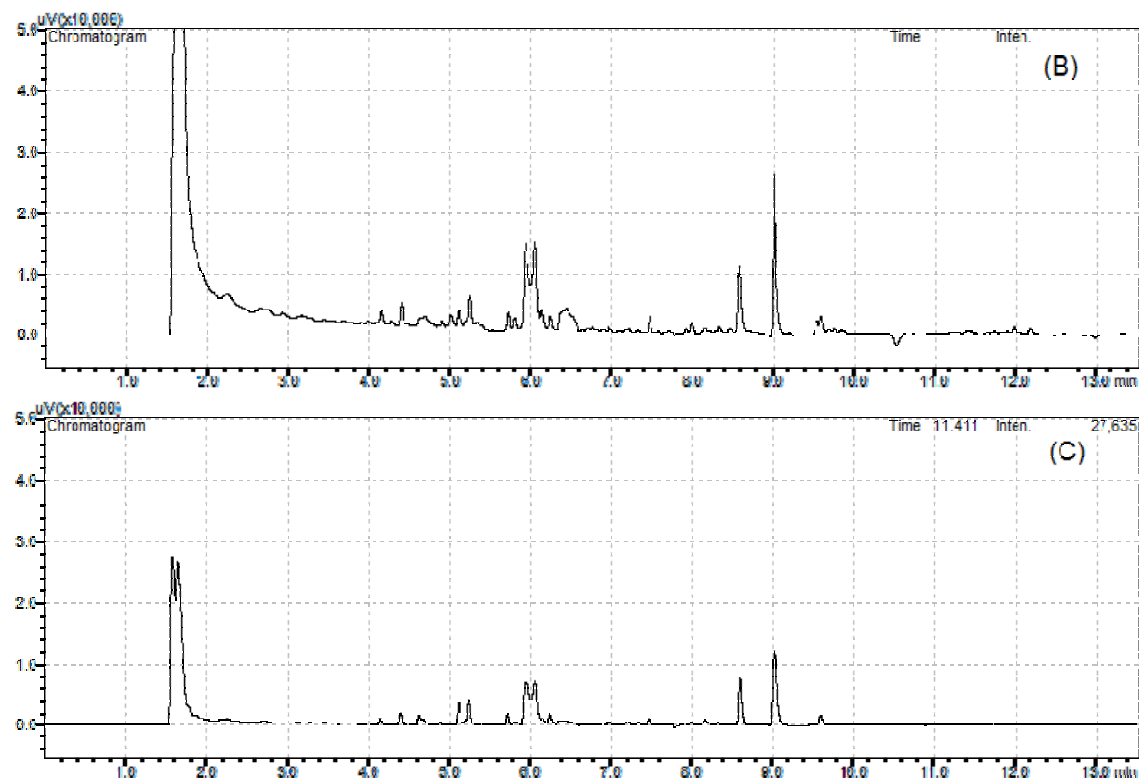


Figura 21 (cont.). (A) Cromatograma do branco sem *clean-up*; (B) Cromatograma do branco passando pelo florissil na etapa de filtração; (C) Cromatograma do branco passando pelo cartucho com florissil.

Como pode ser visto na Figura 31, fazendo uma comparação dos três cromatogramas, não é observada mudança significativa entre eles. No cromatograma (C) houve uma diminuição do pico dos co-extrativos, mas eles não foram removidos. Além disso, não houve mudança apreciável na coloração dos extratos ao passarem pela etapa de *clean-up* com florissil.

Dessa forma, não foi inserida a etapa de *clean-up* com o florissil na metodologia ESL-PBT.

Na Figura 22 estão apresentados os cromatogramas do branco sem *clean-up*, com sílica gel na etapa de filtração e com sílica gel em cartucho.

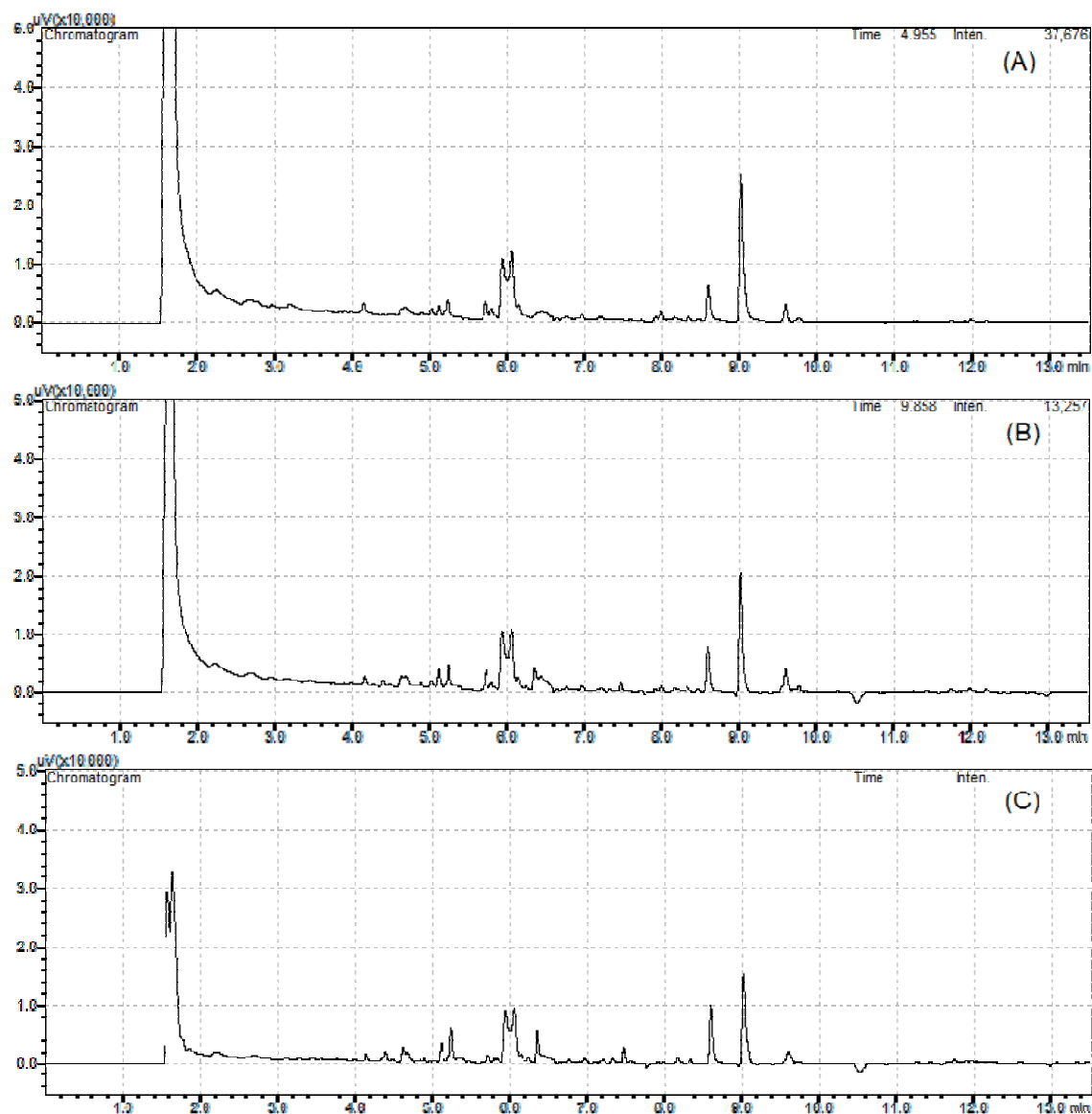


Figura 22. (A) Cromatograma do branco sem *clean-up*; (B) Cromatograma do branco passando pela sílica gel na etapa de filtração; (C) Cromatograma do branco passando pelo cartucho com sílica gel.

Fazendo também uma comparação dos três cromatogramas da Figura 32, não é observada mudança significativa entre eles. Utilizando a sílica gel também não houve mudança apreciável na coloração dos extratos.

Dessa forma, não foi inserida a etapa de *clean-up* com a sílica gel na metodologia ESL-PBT.

5.4.2. *Clean-up* com carvão ativado

A etapa de *clean-up* com carvão ativado é muito útil, principalmente, na

remoção de pigmentos da matriz. Entretanto, o extensivo *clean-up* pode resultar na perda parcial dos agrotóxicos (SCHENCK e LEHOTAY, 2000).

Dessa forma, foi testada a etapa de *clean-up* com carvão ativado adaptada da metodologia de COGO, 2008. Nessa etapa, as amostras foram fortificadas com $0,20 \mu\text{g g}^{-1}$ de clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, procimidona, endossulfam, cipermetrina, $1,00 \mu\text{g g}^{-1}$ de tiametoxam e $0,40 \mu\text{g g}^{-1}$ de permetrina e de deltametrina. Os cromatogramas do branco sem *clean-up*, de um padrão em acetonitrila e de uma amostra fortificada a qual passou pela metodologia ESL-PBT com a etapa de *clean-up* estão apresentados na Figura 23.

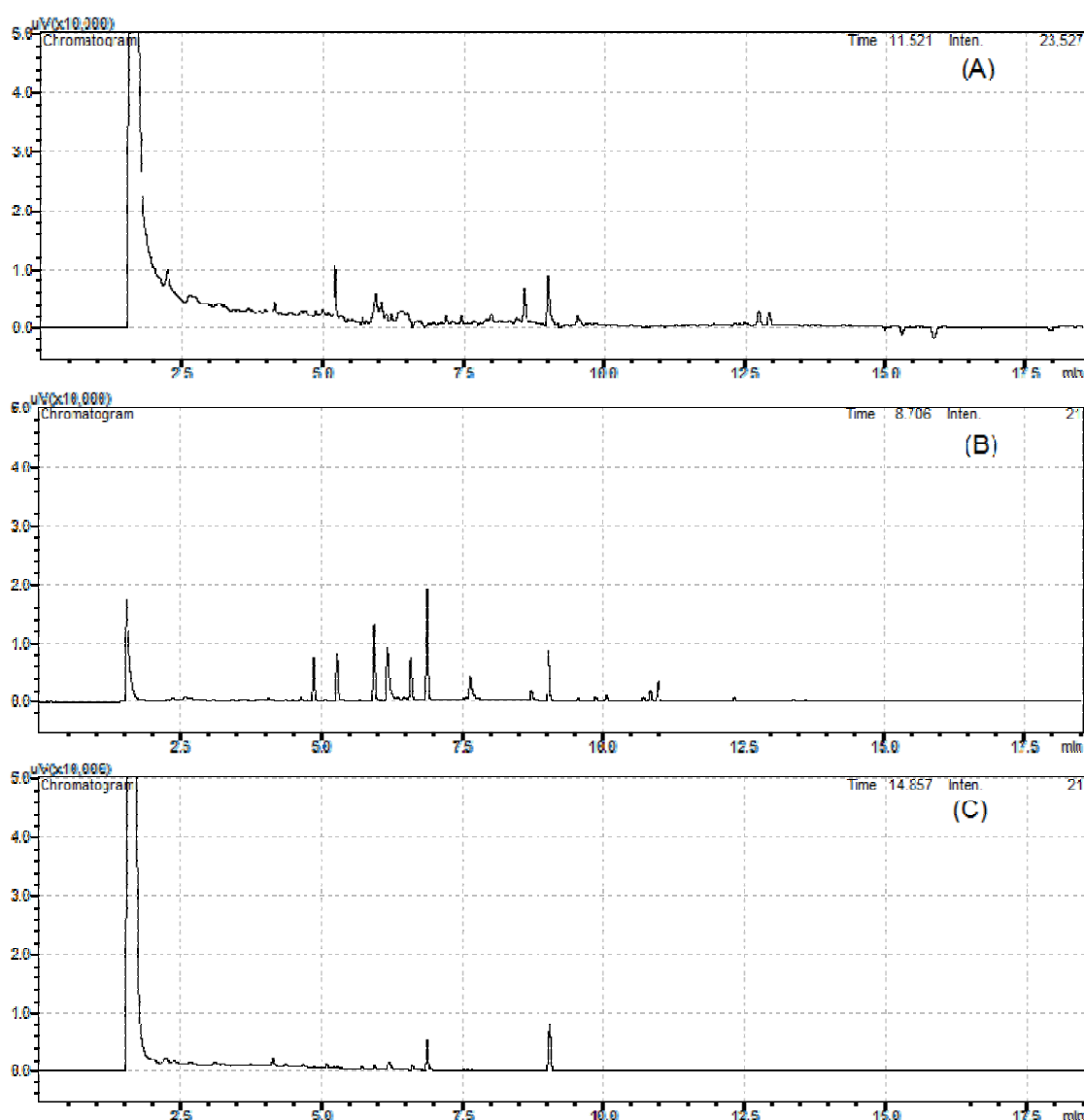


Figura 23. (A) Cromatograma do branco sem *clean-up*; (B) Cromatograma de um padrão em acetonitrila; (C) Cromatograma de uma amostra fortificada que

passou pelo método ESL-PBT utilizando a etapa de *clean-up*.

Comparando os cromatogramas (A) e (C) da Figura 33, observa-se que a etapa de *clean-up* com carvão ativado limpou bastante o extrato, inclusive, a coloração do extrato que era verde, ficou praticamente incolor. Mas, houve a remoção também dos analitos na amostra fortificada tratada com o adsorvente, fato que pode ser observado ao comparar os cromatogramas (B) e (C) da Figura 23.

Vale ressaltar que o único analito que não foi removido completamente foi o (α)-endossulfam ($t_R = 6,883$ minutos). O pico que aparece em 9,046 minutos é o do padrão interno (bifentrina) que foi adicionado direto no “vial” depois da etapa de *clean-up*.

De acordo com o que foi discutido, as etapas de *clean-up* testadas, não foram eficientes, logo, não foi adicionada à metodologia ESL-PBT aplicada a amostras de alface.

5.7. Estudo da estabilidade do analito no solvente e no extrato da matriz

O estudo da estabilidade do analito no solvente e no extrato da matriz são requerimentos de pré-validação que precisam estar em conformidade antes de se iniciar a validação do método. Este estudo é um ítem importante para assegurar uma boa validação e, conseqüentemente, a confiabilidade dos resultados (PASCHOAL *et al.*, 2008). O procedimento utilizado para a avaliação da estabilidade do analito em solvente e no extrato da matriz foi realizado de acordo com o descrito por PASCHOAL *et al.*, 2008.

5.7.1. Estabilidade do analito no solvente

A avaliação da estabilidade do analito foi feita para verificar uma possível degradação dos compostos em solvente (acetonitrila).

Os resultados obtidos para o comportamento dos analitos em solução preparada em solvente armazenada em freezer e em solvente exposta ao ambiente estão apresentados nos gráficos da Figura 24.

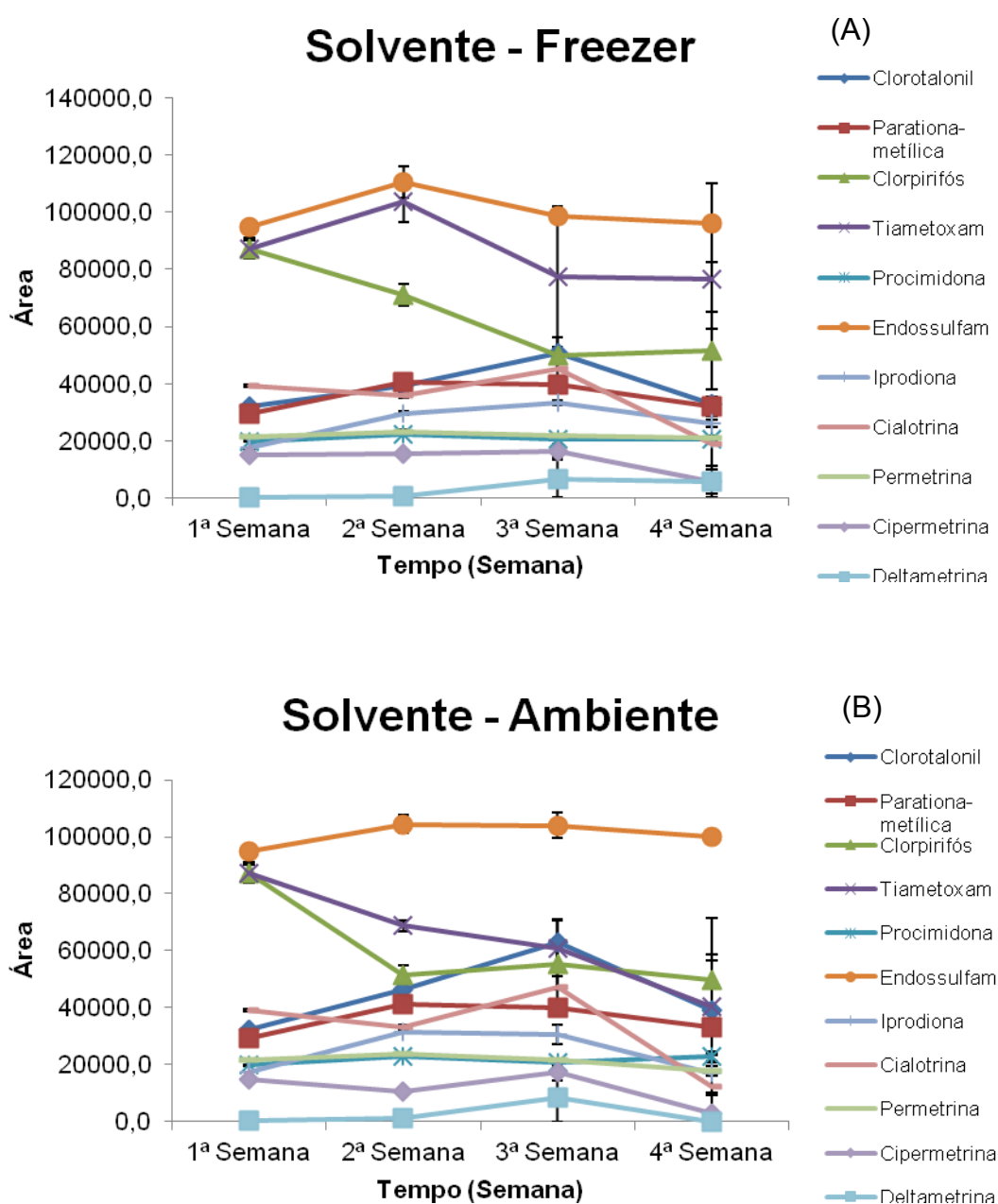


Figura 24. (A) Comportamento dos analitos em solução no solvente armazenada em freezer; (B) Comportamento dos analitos exposta ao ambiente.

Comparando os gráficos (A) e (B) da Figura 34, observa-se que os agrotóxicos como parationa-metílica, iprodiona, λ -cialotrina e deltametrina tiveram um comportamento semelhante em solvente armazenado em freezer e quando exposto ao ambiente. Dessa forma, pode-se dizer que não faz diferença para estes compostos serem ou não armazenados em freezer durante o período estudado.

A permetrina e a procimidona foram os únicos agrotóxicos que tiveram um comportamento que variou pouco. Suas áreas permaneceram praticamente

constantes no decorrer das quatro semanas tanto em freezer quanto exposto ao ambiente, mostrando que estes compostos são estáveis em acetonitrila.

A cipermetrina permaneceu estável nas três primeiras semanas nos dois testes, mas na quarta semana houve uma redução de sua área mostrando uma instabilidade a partir da terceira semana.

O tiametoxam e o clorpirifós se mostraram bem instáveis quando a solução foi exposta ao ambiente, tendo suas áreas reduzidas logo na segunda semana. O clorpirifós teve o mesmo comportamento na solução no freezer.

Sobre o clorotalonil, já existem relatos com relação à sua instabilidade em acetonitrila. MAŠTOVSKÁ e LEHOTAY, 2004 observaram a degradação de dicofol e clorotalonil em soluções de acetona e acetonitrila.

5.7.2. Estabilidade do analito no extrato da matriz

Nesse tópico procurou-se estudar a estabilidade do analito no extrato da matriz com o objetivo de avaliar se existe alguma relação da instabilidade do analito no extrato com a degradação dos co-extrativos da matriz ao longo de quatro semanas. Os resultados obtidos para o comportamento dos analitos na solução feita no extrato da matriz armazenada em freezer e exposta ao ambiente estão apresentados na Figura 25.

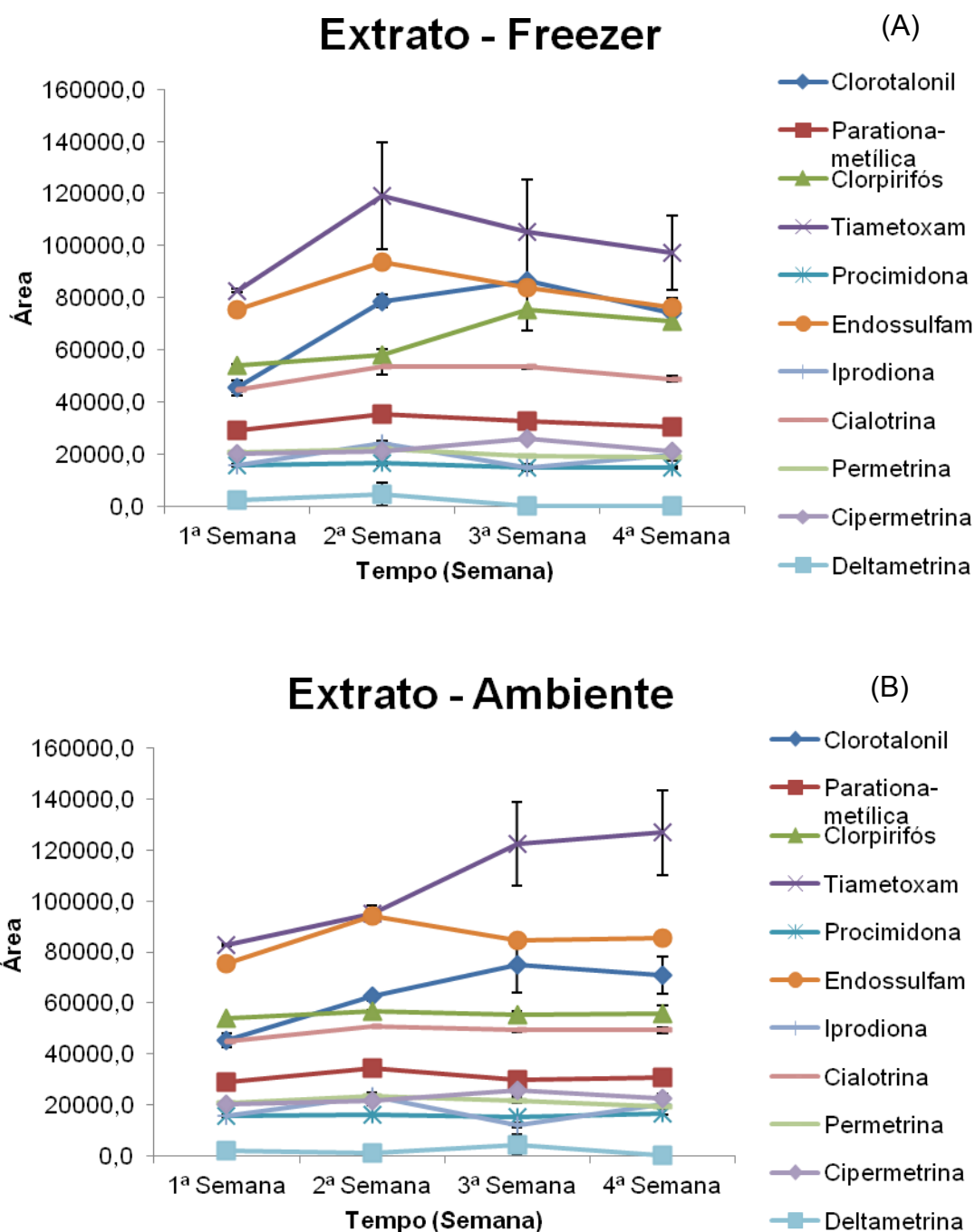


Figura 25. (A) Comportamento dos analitos em solução no extrato armazenada em freezer; (B) Comportamento dos analitos no extrato exposta ao ambiente.

Fazendo-se uma comparação entre os gráficos (A) e (B), observa-se que os agrotóxicos clorotalonil, parationa-metílica, endossulfam, iprodiona, cialotrina, cipermetrina e deltametrina, tiveram, praticamente, o mesmo comportamento tanto quando armazenada no freezer quanto exposta ao ambiente. Logo, pode-se dizer que a degradação dos co-extrativos (Figura

26B) não interfere na estabilidade destes analitos na solução preparada no extrato da matriz.

A procimidona e a permetrina se comportaram de maneira bem parecida quando a solução foi preparada em acetonitrila. São dois compostos que são bastante estáveis em solução preparada tanto em acetonitrila quanto no extrato da matriz. Suas áreas no extrato não diferem estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Tukey no decorrer das quatro semanas.

O tiametoxam foi o composto que apresentou um comportamento bem diferente quando o extrato foi armazenado no freezer ou exposto ao ambiente. Pelo gráfico (B) (Figura 25B), o analito teve sua área aumentada no decorrer das quatro semanas, se mostrando instável à medida que o extrato foi se degradando no decorrer das semanas.

O clorpirifós também apresentou um comportamento bem diferente, se mostrando de certa forma estável frente à degradação dos co-extrativos da matriz (Figura 26B) presentes na solução feita no extrato (Figura 25B).

Os gráficos que mostram a variação do espectro de absorção do extrato ao longo das quatro semanas estão apresentados na Figura 26.

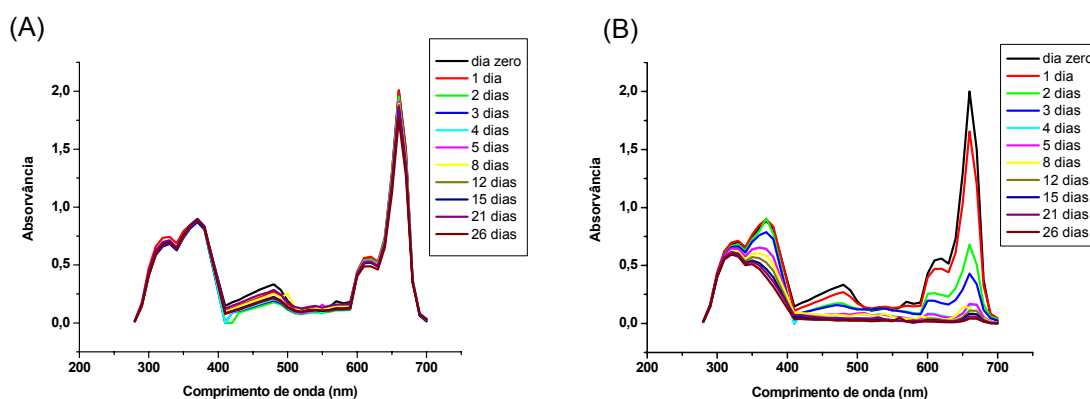


Figura 26. (A) Espectro de absorção do extrato ao longo das quatro semanas em freezer; (B) Espectro de absorção do extrato exposto ao ambiente ao longo das quatro semanas.

Pode-se observar de acordo com a Figura 26 que o comprimento de onda no qual ocorre o máximo de absorção é aproximadamente 660 nm e com o passar dos dias, neste comprimento de onda, a absorção tende a zero no extrato exposto ao ambiente (Figura 26B). Esse comportamento certamente está associado a algum co-extrativo sensível a essas condições. O extrato mantido em freezer permanece com a absorção inalterada (Figura 26A).

5.8. Linearidade de resposta do detector

A linearidade é a resposta obtida em função da concentração do analito, a qual deve ser estudada em um intervalo apropriado (RIBANI *et al.*, 2004).

A linearidade de resposta do detector foi verificada pelas curvas analíticas preparadas conforme descrito no item 4.8. Desta forma, após análise das soluções padrão preparadas em solvente puro em concentrações entre 10,0 e 400,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram construídas curvas analíticas para cada um dos compostos, plotando no eixo y a área do composto de interesse e no eixo x a concentração respectiva do princípio ativo. Na Figura 27 estão representadas as curvas analíticas quando soluções padrão foram analisadas por CG-DCE. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2) determinado pela regressão linear.

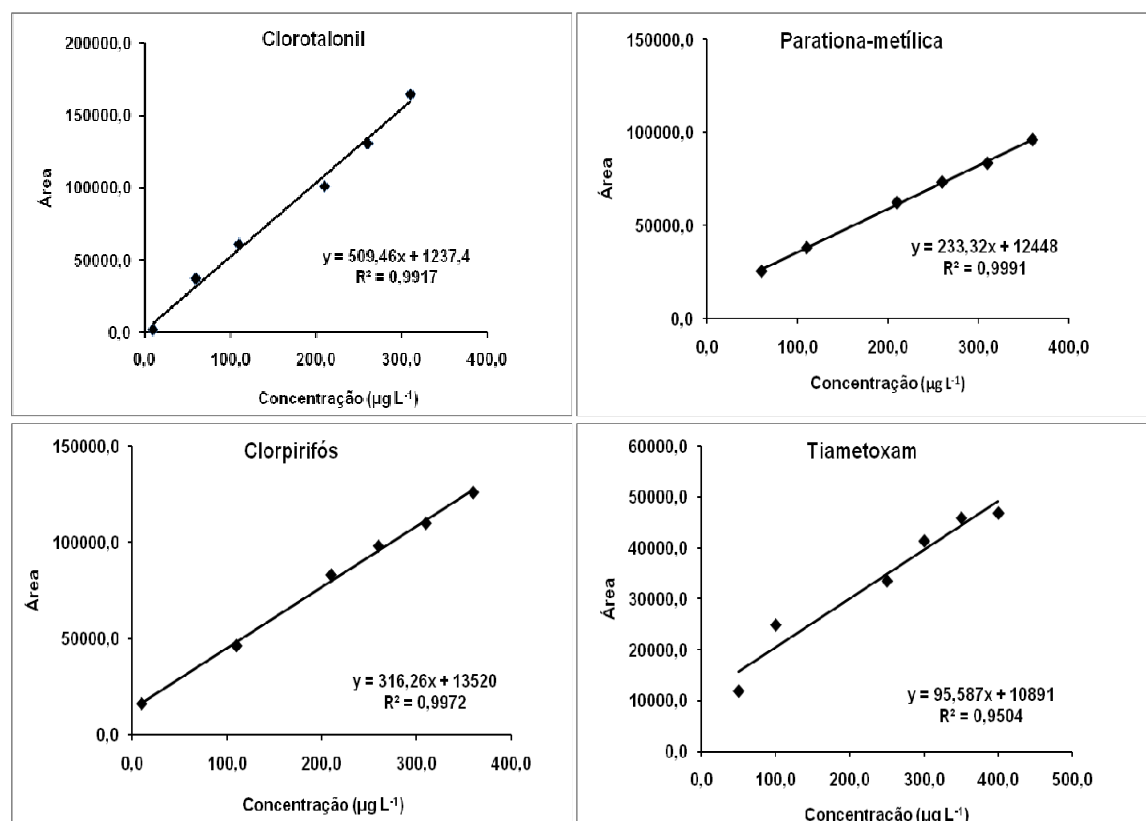


Figura 27. Curvas analíticas preparadas a partir de soluções-padrão dos agrotóxicos na faixa de concentração entre 10,0 e 400,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ analisadas por CG-DCE.

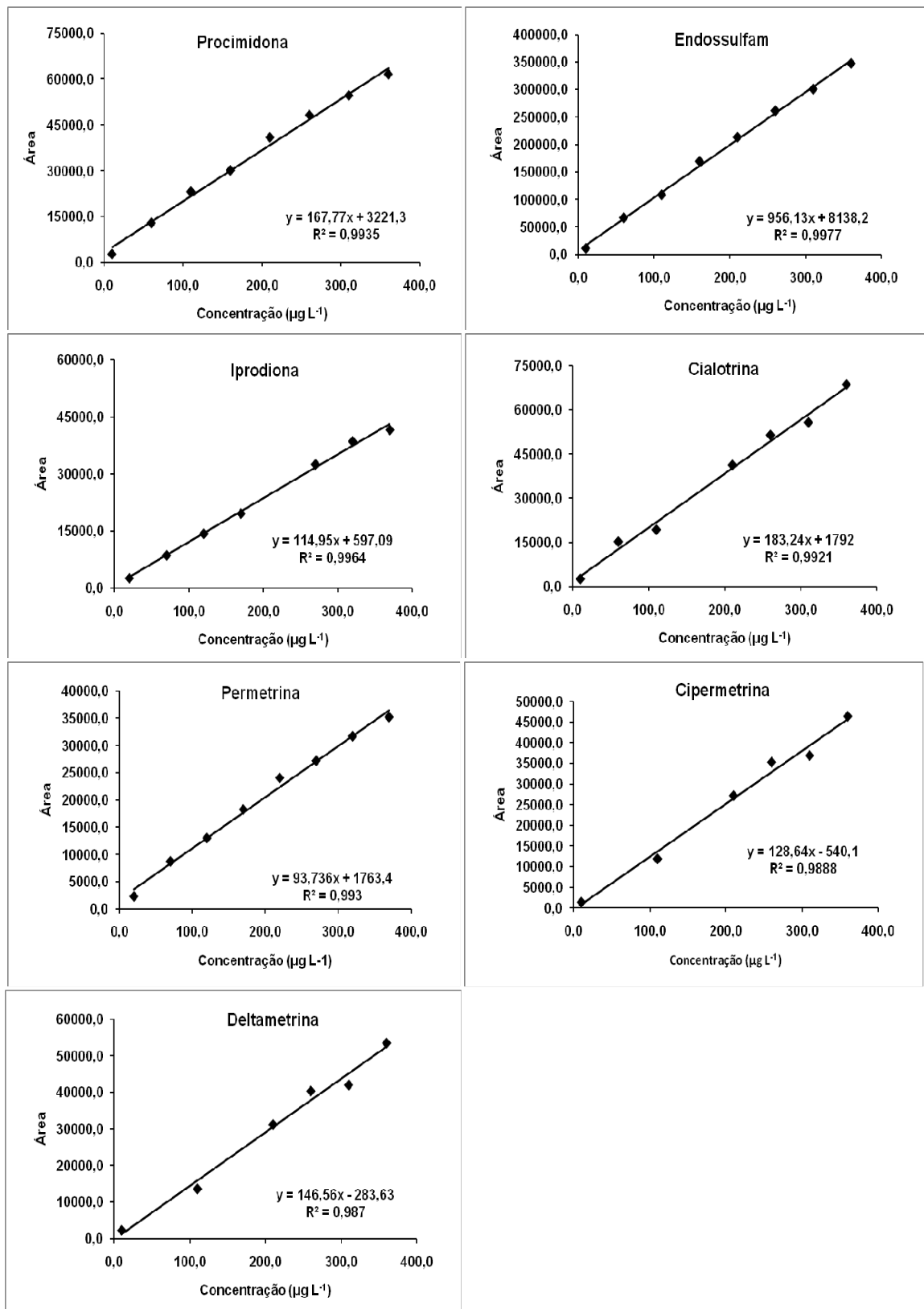


Figura 27 (cont.). Curvas analíticas preparadas a partir de soluções-padrão dos agrotóxicos na faixa de concentração entre 10,0 e 400,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ analisadas por CG-DCE.

Os coeficientes de determinação (R^2) foram apresentados na Figura 27, extraindo a raiz quadrada dos mesmos, obtem-se o coeficiente de correlação (r), que para todos os agrotóxicos, com exceção do tiametoxam ($r = 0,9749$), foram acima de 0,9900. A ANVISA, 2003, recomenda valores superiores a 0,99, enquanto o INMETRO, 2003 recomenda valores acima de 0,90. Dessa forma pode-se dizer que o detector por captura de elétrons responde linearmente aos agrotóxicos na faixa de concentração estudada.

Além disso, pode-se notar pela inclinação das curvas analíticas (Figura 27), que o detector por captura de elétrons é mais sensível aos compostos endossulfam, clorotalonil, clorpirifós e parationa-metílica. Esta sensibilidade está relacionada com a presença e a quantidade de átomos eletronegativos que capturam elétrons, como por exemplo, cloro e oxigênio, presentes na estrutura dos compostos em questão.

5.9. Validação do método analítico

Para avaliar o desempenho do método analítico, vários parâmetros foram considerados, segundo recomendações de PASCHOAL *et al.*, 2008; ICH, 1995; RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA, 2003; INMETRO, 2003 e INMETRO, 2010 e outras publicações. Os parâmetros avaliados foram: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, exatidão e precisão.

5.9.1. Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método quantificar com exatidão o analito na presença de interferentes existentes na amostra (THOMPSON *et al.*, 2002).

Para os métodos cromatográficos a seletividade é avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito (avaliado no tempo de retenção característico) seja proveniente exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra (PASCHOAL *et al.*, 2008).

Para avaliar a seletividade do método de extração e análise por cromatografia compararam-se os cromatogramas dos extratos obtidos pela

ESL-PBT de uma amostra de alface isenta dos agrotóxicos (Figura 28A) com o extrato de uma amostra de alface fortificada com os compostos em estudo (Figura 28B).

As amostras de alface, por possuírem uma composição complexa, apresentaram interferentes no mesmo tempo de retenção do clorpirifós (pico 3) e do tiametoxam (pico 4). Para os demais analitos a metodologia foi seletiva.

Dessa forma, a resposta das áreas obtidas nos picos 3 e 4 da matriz isenta dos agrotóxicos deverá ser compensada subtraindo a área obtida no extrato cuja amostra foi fortificada, pela área obtida no branco.

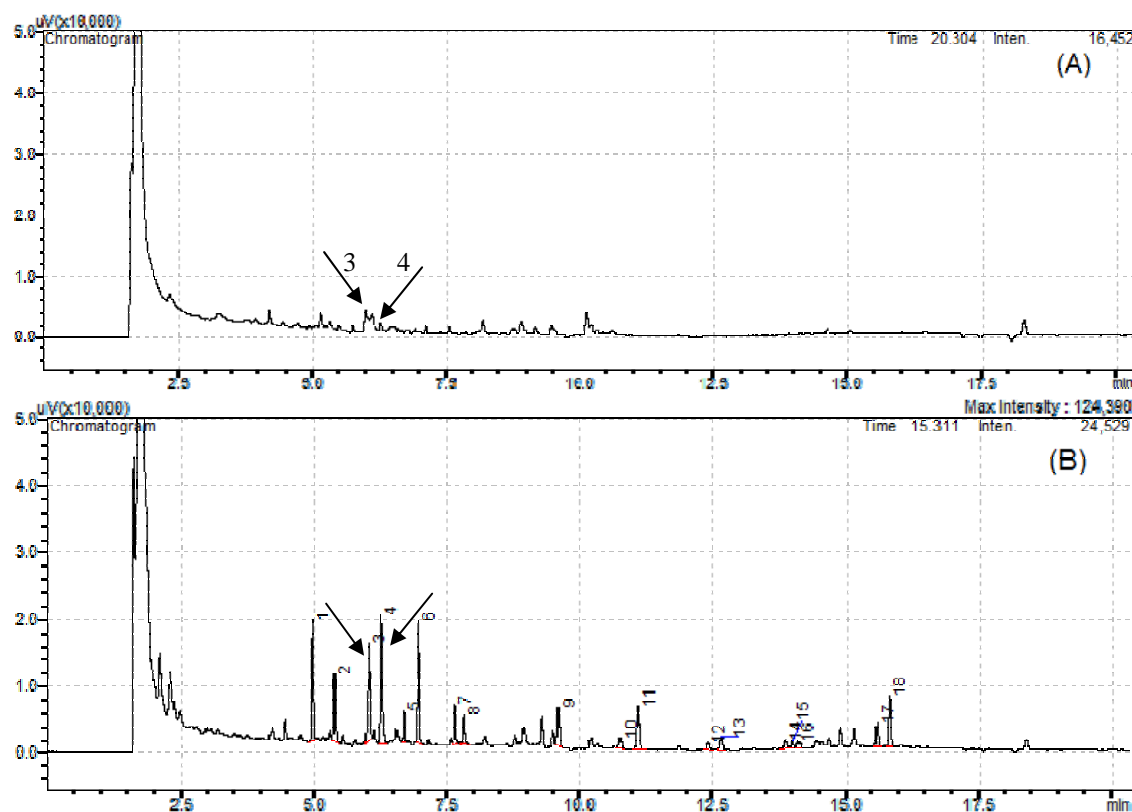


Figura 28. Cromatograma de extrato obtido de uma amostra de alface (A) isenta dos analitos; (B) contendo os analitos a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ para o clorotalonil, parationa-metilica, clorpirifós, procimidona, endossulfam e cipermetrina; $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ para a iprodiona, permetrina e deltametrina; e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ para o tiametoxam onde: 1- clorotalonil: $t_R = 4,94$; 2- parationa-metilica: $t_R = 5,35$; 3- clorpirifós: $t_R = 5,99$; 4- tiametoxam: $t_R = 6,24$; 5- procimidona: $t_R = 6,65$; 6- (α) endossulfam: $t_R = 6,92$; 7- (β) endossulfam: $t_R = 7,61$; 8- iprodiona: $t_R = 7,79$; 9- bifentrina (padrão interno): $t_R = 9,51$; 10 e 11- λ -cialotrina: $t_R = 10,66$ e $10,99$; 12 e 13- permetrina: $t_R = 12,30$ e $12,54$; 14, 15 e 16- cipermetrina: $t_R = 13,76$; $13,91$ e $14,00$; e 17 e 18- deltametrina: $t_R = 15,51$ e $15,74$.

5.9.2. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) é definido como sendo a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas (PASCHOAL *et al.*, 2008). Já o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser expressa com a precisão adequada, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2004).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada um dos agrotóxicos foram determinados pela relação sinal-ruído. A concentração que proporcionou um sinal três vezes maior que o ruído foi estabelecida como sendo o limite de detecção e a que proporcionou um sinal dez vezes maior que o ruído, o limite de quantificação.

Para determinar a relação sinal-ruído é feita a comparação entre a medição das áreas obtidas pela injeção de extratos de amostras com baixas concentrações conhecidas dos compostos de interesse e a medição das áreas obtidas pela injeção de extratos de amostras isentas desses compostos. Assim, fica estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada ou quantificada (RIBANI *et al.*, 2004).

Os valores de LD e LQ obtidos para cada um dos agrotóxicos estudados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método para os onze agrotóxicos.

Agrotóxico	LD (mg kg⁻¹)	LQ (mg kg⁻¹)
Clorotalonil	0,00037	0,00122
Parationa-metílica	0,02800	0,09240
Clorpirifós	0,01100	0,03630
Tiametoxam	0,05200	0,17160
Procimidona	0,00700	0,02310
Endossulfam	0,00047	0,00155
Iprodiona	0,00900	0,02970
λ-cialotrina	0,01100	0,03630
Permetrina	0,03700	0,12210
Cipermetrina	0,00900	0,02970
Deltametrina	0,00900	0,02970

Constatou-se que os valores dos limites de detecção obtidos para os compostos em estudo utilizando CG-DCE estão entre 0,00037 e 0,052 mg kg⁻¹, enquanto os limites de quantificação estão entre 0,00122 e 0,17160 mg kg⁻¹. Os menores valores de LD e LQ são observados para os agrotóxicos clorotalonil e endossulfam.

Considerando os limites máximos de resíduos (LMRs) estabelecidos pela Anvisa, Codex Alimentarius e União Européia (Tabela 4) para os agrotóxicos em estudo, pode-se observar que os valores de LQ obtidos estão abaixo do permitido para a maioria dos compostos de acordo com o tipo de alimento avaliado, com exceção à parationa-metílica, cujo LQ está acima do LMR estabelecido pelo União Européia (0,02 mg kg⁻¹) e o tiametoxam, cujo LQ está acima do LMR estabelecido pela Anvisa (0,05 mg kg⁻¹).

5.9.3. Faixa analítica de resposta do método

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse, dentro de um determinado intervalo de concentrações onde o método será aplicado (VALDERRAMA *et al.*, 2009).

A qualidade da curva analítica é estimada através do coeficiente de correlação (r). Se este valor for próximo a 1,00, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A ANVISA, 2003 recomenda um coeficiente de correlação maior que 0,99 e o INMETRO, 2003 um valor acima de 0,90.

Desta forma, após análise dos extratos preparados a partir de amostras de alface fortificadas em concentrações entre 0,6 e 1098,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ e submetidos ao método de ESL-PBT, foram construídas curvas analíticas para cada um dos compostos em estudo e avaliadas por métodos estatísticos como regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para a maioria dos analitos.

A linearidade de resposta do método foi verificada pelas curvas analíticas preparadas conforme descrito no item 4.9.3., pelo cálculo do coeficiente de correlação (r).

As equações das curvas analíticas, bem como os valores de R^2 (coeficiente de determinação) obtidos para cada composto pelo método da superposição de matriz, são apresentadas na Figura 29.

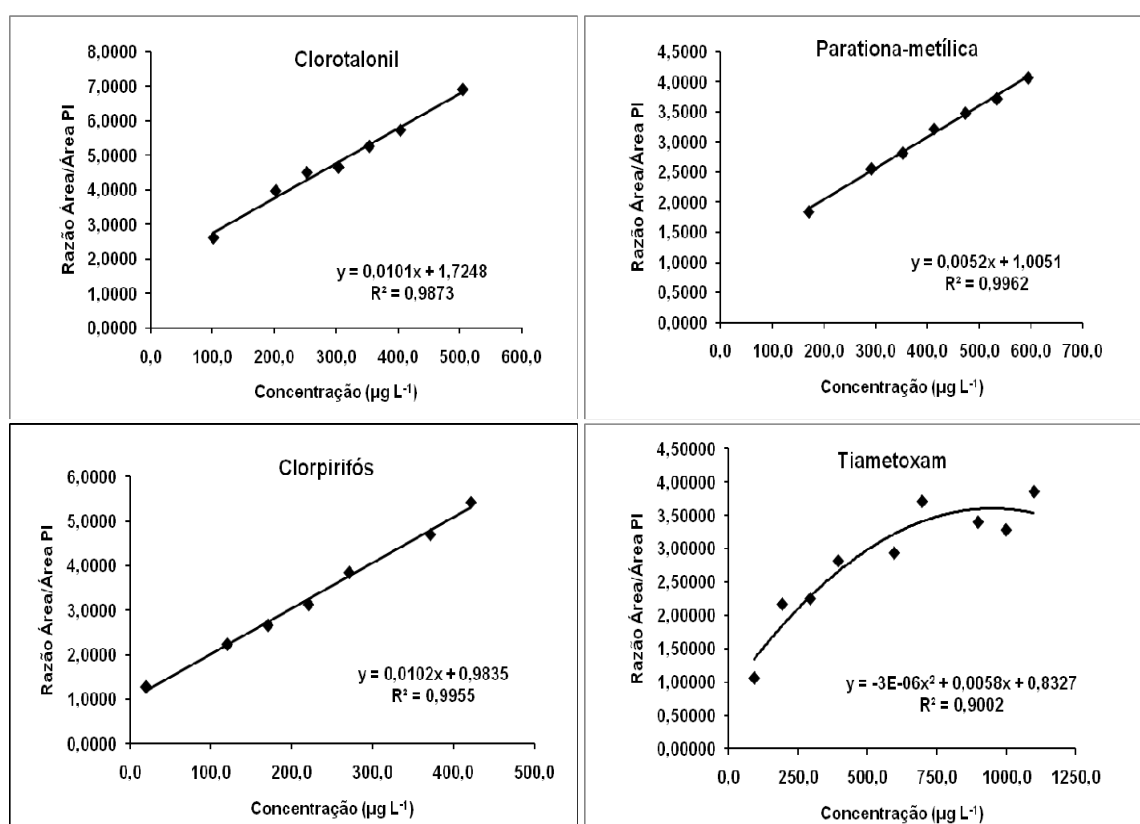


Figura 29. Curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de alface fortificadas com padrão dos analitos em estudo na faixa de concentração entre 0,6 e 1098,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ analisados por CG-DCE.

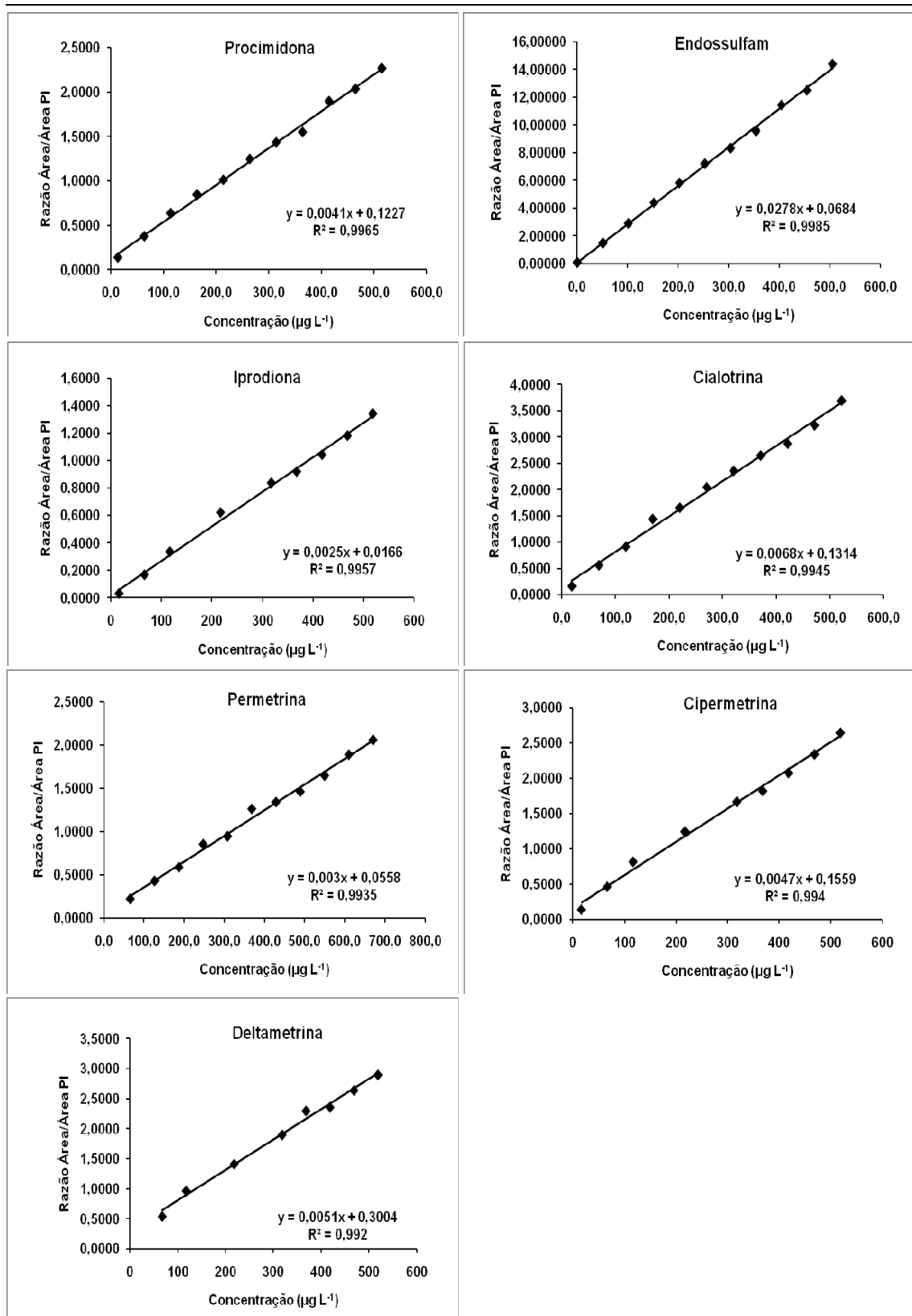


Figura 29 (cont.). Curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de alface fortificadas com padrão dos analitos em estudo na faixa de concentração entre 0,6 e 1098,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ analisados por CG-DCE.

Os valores dos coeficientes de correlação (r) (Tabela 9) obtidos extraíndo a raiz quadrada dos coeficientes de determinação (R^2) variaram de 0,9488 (tiametoxam) a 0,9992 (endossulfam). Assim, as curvas analíticas obtidas pela superposição de matriz utilizando o método do padrão interno, na faixa de concentração estudada, mostraram-se lineares para a maioria dos compostos, uma vez que o r foi maior que 0,99 e 0,90, conforme recomendações da ANVISA, 2003 e INMETRO, 2003, respectivamente.

É importante ressaltar que o tiametoxam é um composto que não se adequou ao modelo linear. Dessa forma o modelo que melhor descreveu a relação concentração-resposta foi o modelo polinomial.

Tabela 9. Coeficientes de correlação obtidos para cada composto.

Agrotóxico	Coefficiente de correlação (r)
Clorotalonil	0,9936
Parationa-metílica	0,9981
Clorpirifós	0,9975
Tiametoxam	0,9488
Procimidona	0,9982
Endossulfam	0,9992
λ -cialotrina	0,9972
Iprodiona	0,9978
Permetrina	0,9967
Cipermetrina	0,9970
Deltametrina	0,9960

5.9.4. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, usando um procedimento experimental para uma mesma amostra por repetidas vezes (THOMPSON *et al.*, 2002).

A exatidão pode ser obtida mediante uso de material de referência certificado (MRC), comparação de métodos ou, ensaios de recuperação

(MILLER e MILLER, 1993), sendo que este último foi utilizado para avaliar a exatidão do método ESL-PBT proposto neste trabalho.

As porcentagens de extração referentes aos ensaios de recuperação foram calculadas adicionando os agrotóxicos às amostras de alface em concentrações iguais a uma, duas e dez vezes os seus limites de quantificação (LQ). Desta forma, as concentrações nessas amostras foram iguais a: 0,6; 1,32 e 6,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o clorotalonil; 49,5; 99,0 e 495,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a parationa-metílica; 19,8; 39,6 e 198,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o clorpirifós e λ -cialotrina 92,4; 184,8 e 924,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o tiametoxam; 13,2; 26,4 e 132,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a procimidona; 0,8; 1,65 e 8,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o endossulfam; 16,5; 33,0 e 165,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a iprodiona, cipermetrina e deltametrina e 66,0; 132,0 e 660,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a permetrina.

Os ensaios de recuperação foram realizados extraindo-se as substâncias de interesse, presentes na matriz, conforme o procedimento otimizado.

Os resultados obtidos para extração destes agrotóxicos em amostras de alface, bem como os coeficientes de variação (CV) referentes às porcentagens de recuperação de cada agrotóxico estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Porcentagens de recuperação (% R) e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de extratos de amostra de alface fortificada com os agrotóxicos em três concentrações diferentes.

Agrotóxico	LQ		2LQ		10LQ	
	% R	CV	% R	CV	% R	CV
Clorotalonil	101,8	5,2	103,2	0,9	97,7	0,3
Parationa-metílica	76,9	3,2	77,6	3,7	77,1	2,1
Clorpirifós	72,8	16,1	75,5	5,4	71,8	19,2
Tiametoxam	57,3	2,4	63,3	18,1	60,2	9,8
Procimidona	73,1	1,5	75,9	2,5	75,9	0,8
Endossulfam	85,7	0,4	86,5	4,5	84,4	1,1
Iprodiona	80,1	6,7	78,2	5,1	81,0	2,3
λ -cialotrina	73,2	3,4	79,9	8,1	74,2	4,6
Permetrina	73,9	3,7	76,3	4,8	72,3	3,4
Cipermetrina	82,4	1,4	84,6	10,2	81,8	2,7
Deltametrina	86,7	5,4	89,4	11,8	87,2	1,8

Os resultados obtidos para a extração dos agrotóxicos estudados em alface são estatisticamente equivalentes entre si, ao nível de 95 % de confiança, pelo Teste de Tukey, mostrando exatidão do método. Além disso, os coeficientes de variação para a maioria dos compostos, com exceção do clorpirifós, tiametoxam e deltametrina, apresentaram-se menores do que 10 %.

5.9.5. Precisão

A precisão corresponde ao grau de concordância de resultados de testes independentes obtidos sob condições estabelecidas e é expressa pela estimativa do desvio padrão (s) ou estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) (THOMPSON *et al.*, 2002).

5.9.5.1. Repetitividade

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo (RIBANI *et al.*, 2004).

Neste estudo, a repetitividade foi avaliada pelo cálculo da estimativa do coeficiente de variação (CV) de sete repetições do procedimento otimizado de ESL-PBT para os compostos de interesse.

Os resultados do coeficiente de variação obtidos para a amostra de alface estão apresentados na Tabela 11. Esses resultados indicam boa repetitividade, já que para amostras complexas são aceitáveis coeficientes de variação de até 20% (RIBANI *et al.*, 2004).

Tabela 11. Porcentagem de recuperação (% R) e coeficiente de variação (CV) obtido após sete extrações dos agrotóxicos em amostra de alface.

Agrotóxico	% de recuperação	Coeficiente de variação
Clorotalonil	103,2	0,9
Parationa-metílica	77,6	3,7
Clorpirifós	75,5	5,4
Tiametoxam	63,3	18,1
Procimidona	75,9	2,5
Endossulfam	86,5	4,5
Iprodiona	78,2	5,1
λ -cialotrina	79,9	8,1
Permetrina	76,3	4,8
Cipermetrina	84,6	10,2
Deltametrina	89,4	11,8

5.9.5.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores (ICH, 1995).

A avaliação da precisão intermediária do método foi verificada pelas porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em amostra de alface fortificada com uma concentração igual a duas vezes o limite de quantificação de cada composto, e respectivos coeficientes de variação (CV) analisados em três dias diferentes. As análises foram realizadas ao terceiro e quinto dia após o primeiro teste, pelo mesmo analista e mesmo equipamento. Os resultados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Porcentagem de recuperação (% R) e coeficiente de variação (CV) obtidos após análise em dias diferentes, pelo mesmo analista.

Agrotóxico	1º dia		3º dia		5º dia	
	% R	CV	% R	CV	% R	CV
Clorotalonil	103,2	0,9	99,4	5,2	102,5	3,4
Parationa-metílica	77,6	3,7	73,5	4,9	75,6	9,2
Clorpirifós	75,5	5,4	74,4	2,1	71,3	6,4
Tiametoxam	63,3	18,1	66,2	3,3	65,3	2,4
Procimidona	75,9	2,5	74,9	3,9	75,1	4,6
Endossulfam	86,5	4,5	83,2	1,8	85,0	17,6
Iprodiona	78,2	5,0	76,4	4,0	80,4	12,7
λ -cialotrina	79,9	8,1	76,4	1,0	82,0	8,1
Permetrina	76,3	4,8	73,3	5,6	74,0	5,4
Cipermetrina	84,6	10,2	80,2	2,7	85,7	2,9
Deltametrina	89,4	11,8	89,0	0,4	87,0	4,9

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 12, pode-se afirmar que a técnica de extração proporciona porcentagens de recuperação estatisticamente iguais (ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Tukey). Portanto, verificou-se que a técnica ESL-PBT para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostra de alface, apresentou resultados satisfatórios em relação à precisão intermediária, com coeficientes de variação menores que 10% para a maioria dos compostos.

5.10. Avaliação do efeito de matriz

A análise dos extratos de amostras complexas, como por exemplo, alface, pode apresentar diversos problemas causados por componentes da matriz quando injetadas no sistema cromatográfico. Tais problemas podem ocorrer tanto no detector quanto no injetor, sendo denominado de efeito de matriz (HAJSLOVÁ e ZROSTLÍKOVÁ, 2003). O efeito de matriz, também conhecido como “aumento da resposta cromatográfica induzida pela matriz”, é usado para explicar as taxas de recuperação de agrotóxicos que excederem 100% e a baixa precisão de resultados (HAJSLOVÁ *et al.*, 1998).

Uma alternativa utilizada para avaliar o efeito de matriz é a construção

da curva analítica no próprio extrato da matriz (método adição de padrão), livre de resíduos de agrotóxicos (PINHO *et al.*, 2010). Dessa forma, duas séries de soluções-padrão foram preparadas de acordo com procedimento do item 4.10, sendo uma em solvente puro e a outra em extratos de amostras de alface isentas dos agrotóxicos em estudo. As curvas analíticas preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz foram comparadas para cada composto (Figura 30).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 30, observam-se diferenças entre os coeficientes angulares e lineares das equações das duas curvas analíticas para cada agrotóxico.

Pela comparação dessas curvas analíticas, observa-se que para os agrotóxicos clorotalonil, clorpirifós, tiametoxam, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina os resultados obtidos mostraram menores coeficientes angulares para as curvas preparadas em acetonitrila, indicando menores respostas cromatográficas quando comparadas com as curvas analíticas preparadas no extrato da matriz. Dessa forma, pode-se dizer que estes compostos sofrem maior interferência positiva dos componentes da matriz (co-extrativos).

De acordo com KLOTZ *et al.*, 2001 agrotóxicos mais polares apresentam efeito de matriz significativo, sendo o grau de polaridade classificado de acordo com a solubilidade em água ou K_{ow} (coeficiente de partição octanol/água). Este fato justifica o efeito de matriz pronunciado para o tiametoxam, pois, este é o composto mais polar ($K_{ow}= 7,41 \times 10^{-01}$) entre os agrotóxicos estudados.

Compostos menos polares como é o caso do clorpirifós e dos piretróides λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, apresentaram efeito de matriz significativo pelo fato de possuírem uma elevada massa molar (acima de 350 g mol^{-1}) que dificulta a volatilização e dessa forma, menor quantidade de analito é introduzida na coluna cromatográfica quando preparado em solvente puro, produzindo menores respostas (SANCHES-BRUNET *et al.*, 2005).

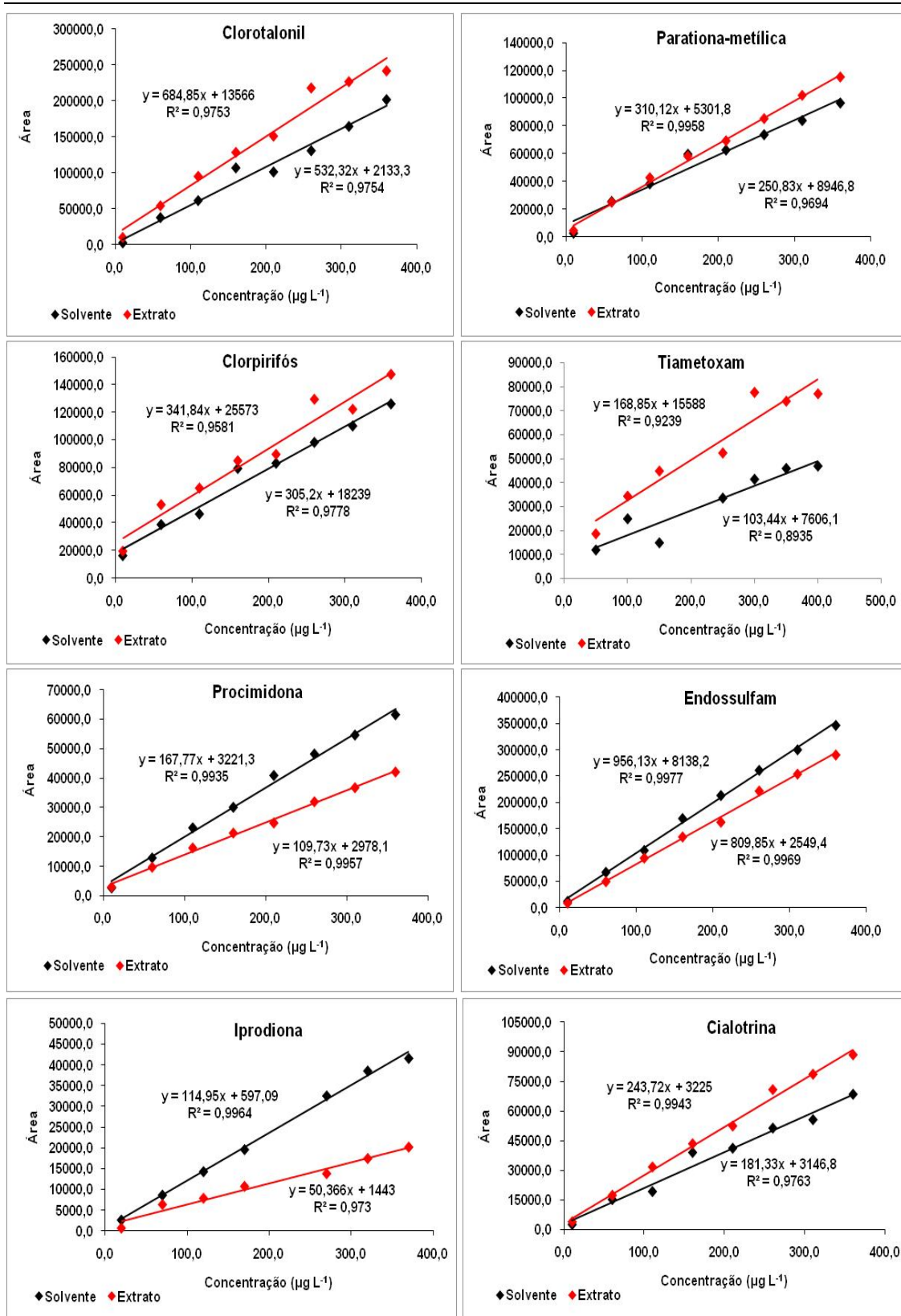


Figura 30. Curvas analíticas preparadas em acetonitrila e na matriz para cada agrotóxico.

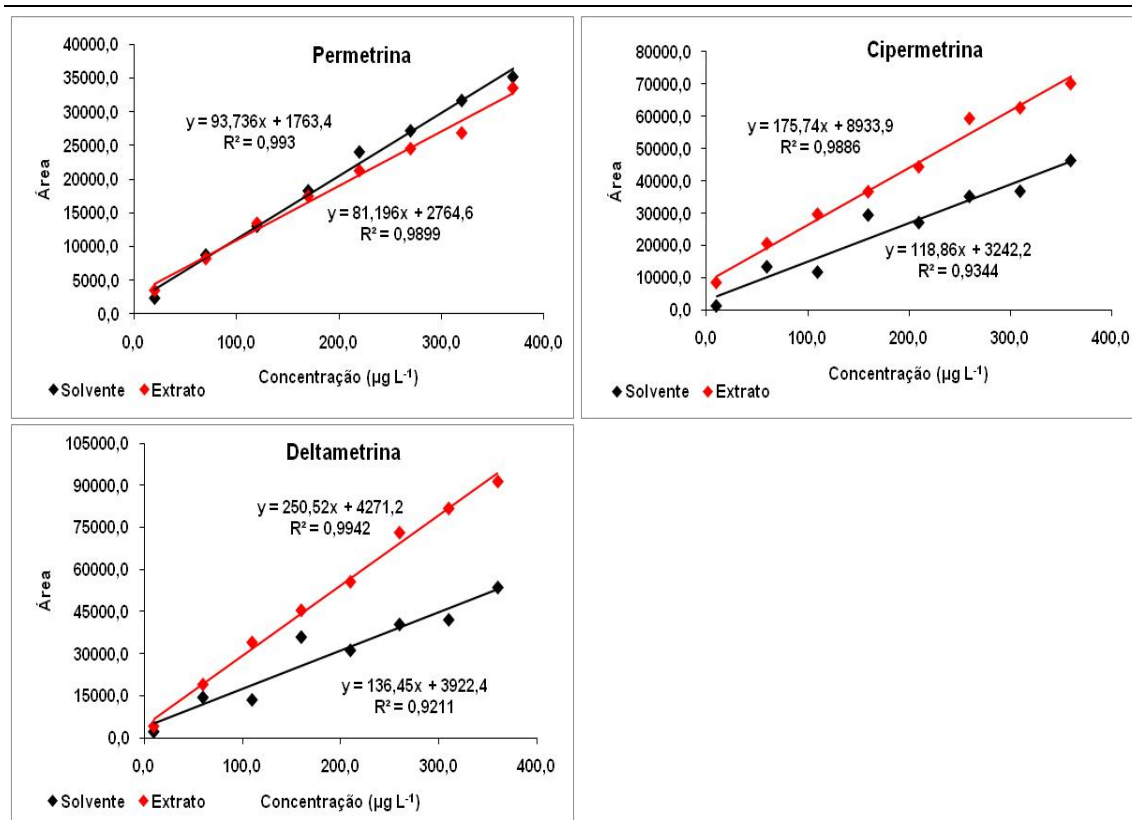


Figura 30 (cont.). Curvas analíticas preparadas em acetonitrila e na matriz para cada agrotóxico.

Já para os compostos procimidona, endossulfam e iprodiona, os resultados obtidos mostraram maiores inclinações para as curvas preparadas em acetonitrila, indicando maiores respostas cromatográficas quando comparadas com as curvas analíticas preparadas no extrato da matriz. Logo, os compostos sofreram interferência negativa dos co-extrativos. Este fato pode estar relacionado com um problema associado com injeções dos analitos em extrato da matriz. Nessas injeções pode ocorrer o acúmulo gradual de componentes da matriz não-voláteis no sistema do CG, resultando na formação de novos sítios ativos, diminuindo as respostas dos analitos. Este fato é muitas vezes chamado de indução da diminuição da resposta pela matriz (MAŠTOVSKÁ *et al.*, 2004).

A parationa-metílica e a permetrina foram os compostos que apresentaram pequena mudança na inclinação e nos coeficientes lineares das curvas. Isso comprova que para estes compostos, a presença dos componentes da matriz não interferiu, de forma significativa em suas análises cromatográficas.

Para a avaliação do grau do efeito de matriz dos extratos de alface nas

análises por CG-DCE, foi feita uma comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas em solvente com as obtidas com soluções analíticas preparadas nos extratos da matriz. O cálculo foi efetuado através da Equação 1 do item 4.10 e os resultados do grau do efeito de matriz são apresentados na Figura 31.

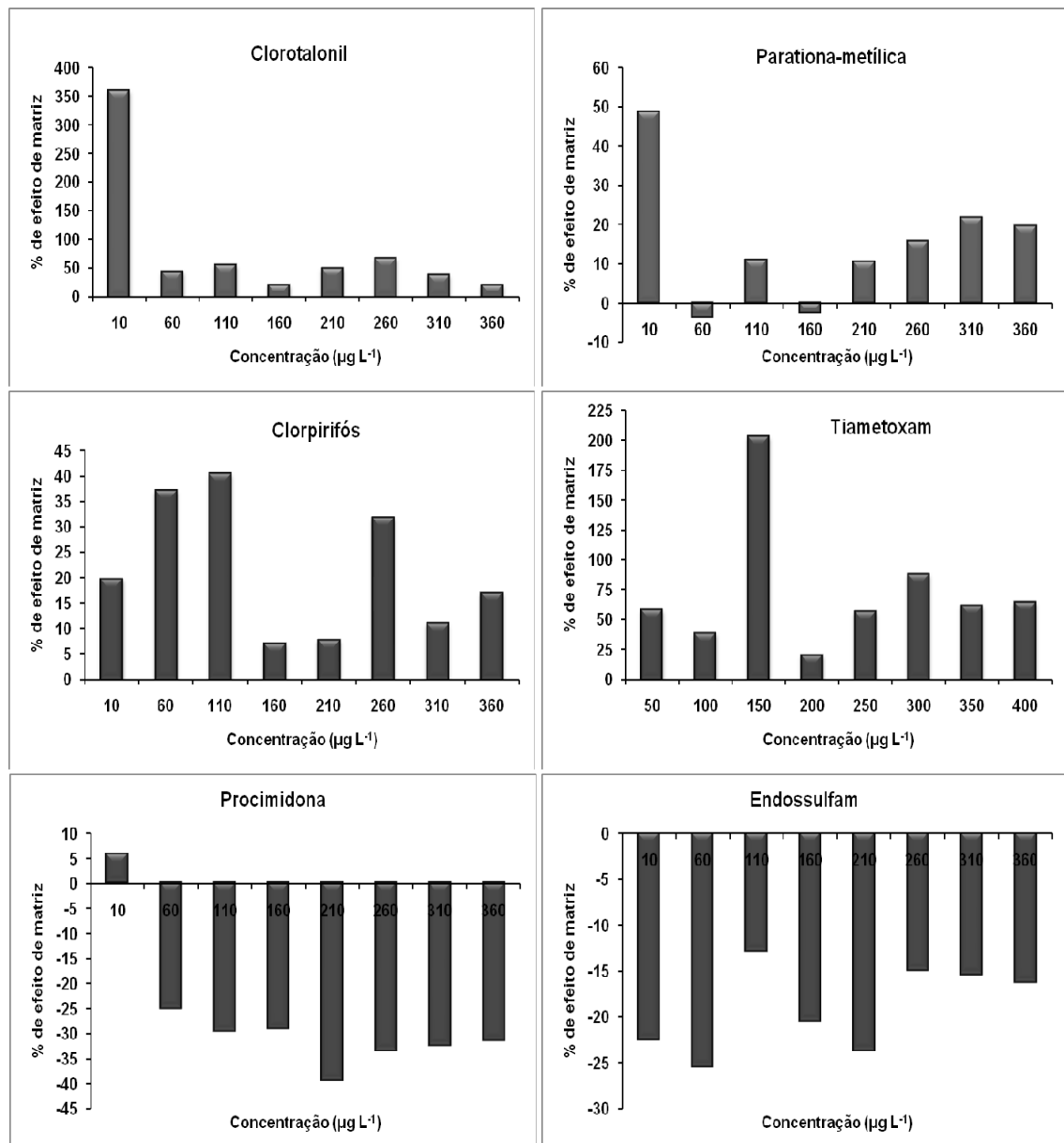


Figura 31. Grau do efeito de matriz para os agrotóxicos em estudo em amostra de alface.

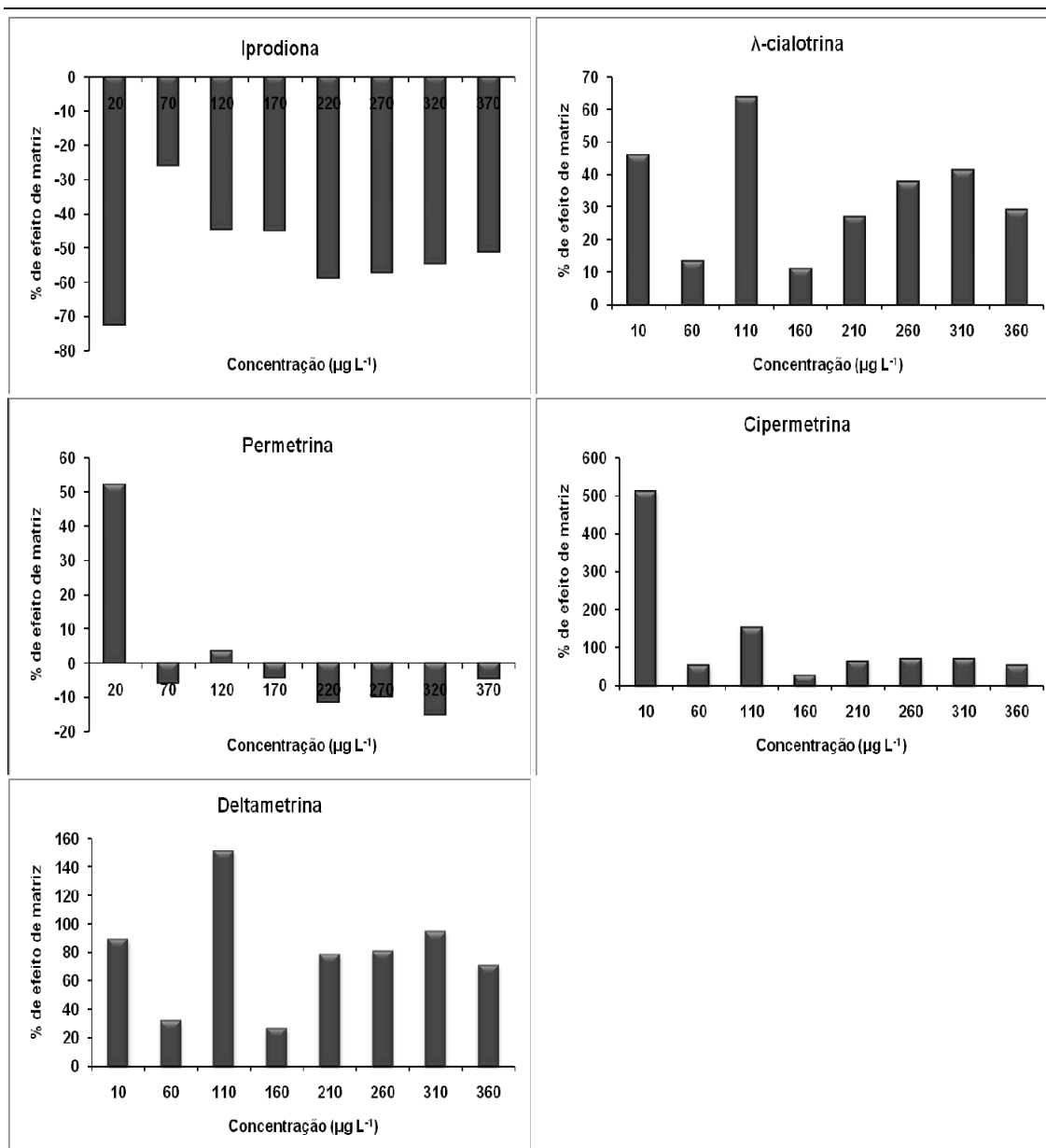


Figura 31(cont.). Grau do efeito de matriz para os agrotóxicos em estudo em amostra de alface.

Pode-se observar pelos gráficos da Figura 31 que para o clorotalonil, o maior efeito de matriz acontece para a menor concentração (10,0 µg L⁻¹). Nesta concentração, a variação da resposta foi de cerca de 350%. Nas demais concentrações, o efeito de matriz foi bem menor.

Para a parationa-metfílica, verifica-se efeito de matriz positivo sendo a maior variação da resposta também para a menor concentração (10,0 µg L⁻¹). Para as concentrações de 60 e 160 µg L⁻¹ observa-se um efeito de matriz negativo pouco significativo (abaixo de -10%). Para as demais concentrações, existe um efeito de matriz positivo ≤ 20%.

O clorpirifós foi um composto que sofreu efeito de matriz positivo para todas as concentrações, sendo mais significativo este efeito para a concentração de $110,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

Para o tiametoxam observa-se um maior efeito de matriz para a concentração de $150,0 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo a variação da resposta de cerca de 200%.

Para a procimidona, endossulfam e iprodiona verificam-se um efeito de matriz negativo para todas as concentrações, com exceção da procimidona que na concentração de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ apresentou um efeito de matriz positivo, mas que não foi significativo (cerca de 5%).

A λ -cialotrina foi um composto que também apresentou efeito de matriz positivo para todas as concentrações estudadas. Sendo este efeito maior para a concentração de $110,0 \mu\text{g L}^{-1}$, onde a variação da resposta foi de 65%.

A permetrina sofreu efeito de matriz negativo para a maioria das concentrações, mas este efeito foi pouco significativo ($\leq -15\%$). Para a concentração de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ obteve-se um efeito de matriz positivo, sendo a variação da resposta de aproximadamente 55%.

Para a cipermetrina e a deltametrina observa-se somente efeito de matriz positivo, sendo para a cipermetrina a maior variação da resposta na concentração de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (aproximadamente 500%) e para a deltametrina na concentração de $110,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (aproximadamente 150%).

De acordo com HAJŠLOVÁ *et al.*, 1998, o efeito de matriz é maior para as baixas concentrações de agrotóxicos. Resultados obtidos para o clorotalonil, parationa-metilica, permetrina e cipermetrina mostram que esta afirmação é verdadeira.

Pode-se concluir dessa forma que, para a maioria dos agrotóxicos, os componentes da matriz contribuem para a variação da resposta cromatográfica de forma positiva ou negativa.

A correção desses erros nas taxas de recuperação dos agrotóxicos pode ser obtida com preparo de uma curva analítica substituindo o solvente puro por extratos da matriz isenta de agrotóxicos (branco da matriz), durante a diluição das soluções padrão nas diversas concentrações (RIBANI *et al.*, 2004).

5.11. Aplicação do método

O método desenvolvido foi aplicado na análise de alface da horta do Campo Experimental Prof. Diogo Alves de Mello do Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa – UFV. O experimento foi conduzido nos meses de outubro e novembro de 2010.

Neste experimento, foi avaliada a persistência dos agrotóxicos clorotalonil, tiametoxam, procimidona e iprodiona em amostras de alface, coletadas em diferentes dias após a aplicação de cada produto.

Para o clorotalonil as amostras foram coletadas no 3º e 11º dia após a aplicação; para a iprodiona no 3º, 11º e 15º dia; para a procimidona no 2º e 4º dia; e para o tiametoxam no 3º, 11º, 15º, 20º e 25º dia.

As amostras foram preparadas conforme o método validado (item 5.3.) e os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 13.

Tabela 13. Concentrações dos princípios ativos ao longo dos dias de coleta após a aplicação dos mesmos.

Agrotóxico	Concentração (mg kg ⁻¹)						
	2º	3º	4º	11º	15º	20º	25º
Clorotalonil		43,0±2,9		1,8±4,0x10 ⁻³			
Tiametoxam		11,5±3,2		1,3±0,4	0,3±4,5x10 ⁻²	0,1±1,0x10 ⁻²	< LD
Procimidona	35,2±4,8		23,3±2,0x10 ⁻³				
Iprodiona		68,9±12,5		4,7±0,4	0,6±0,1		

Os fungicidas clorotalonil e iprodiona apresentaram maiores concentrações residuais nas amostras de alface no 3º dia após a aplicação, que foram de 43,0 mg kg⁻¹ e 68,9 mg kg⁻¹, respectivamente.

O inseticida tiametoxam e o fungicida procimidona, apresentaram concentração residual máxima de 11,5 mg kg⁻¹ e 35,2 mg kg⁻¹, respectivamente, sendo para o tiametoxam após o 3º dia de aplicação e para a procimidona após o 2º dia.

Para o tiametoxam, vale salientar que a partir do 25º dia não foi possível a quantificação, pois, a concentração residual foi menor que o LD do método.

De acordo com a Tabela 6 (item 4.11) o intervalo de segurança para o clorotalonil é de 10 dias por isso que as amostras foram coletadas até o 11º dia após a aplicação. Pelos resultados apresentados na Tabela 13, no 11º dia a concentração encontrada foi de $1,8 \text{ mg kg}^{-1}$, menor que o LMR ($6,0 \text{ mg kg}^{-1}$), isso mostra a importância de se respeitar o intervalo de segurança de cada produto.

Para o tiametoxam, o intervalo de segurança é de 40 dias, mas a coleta foi feita apenas até o 25º dia após a aplicação porque a partir desse dia, a alface já não é mais comerciável. Mas, pode-se perceber pelos resultados da Tabela 13 que a partir do 20º dia, a concentração do princípio ativo ($0,1 \text{ mg kg}^{-1}$) já se aproxima do LMR que para o tiametoxam é de $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$, mostrando mais uma vez a importância de se respeitar o período de carência do produto visando a segurança alimentar.

A procimidona que tem um período de carência de três dias, apresentou uma concentração ($23,3 \text{ mg kg}^{-1}$) no 4º dia após a aplicação, acima do LMR ($5,0 \text{ mg kg}^{-1}$). Este fato leva-se a um questionamento em relação ao intervalo de segurança para este princípio ativo. De acordo com os resultados, sugere-se um período de carência maior para que o consumo do alimento seja mais seguro.

Já a iprodiona que tem um período de carência de quatorze dias, apresentou uma concentração de $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ no 15º dia após a aplicação. Essa concentração está abaixo do LMR ($1,0 \text{ mg kg}^{-1}$), comprovando que o intervalo de segurança foi respeitado e que a utilização das boas práticas agrícolas é de extrema importância para garantir a qualidade do alimento que chega até o consumidor.

6. CONCLUSÕES

A técnica de ESL-PBT foi otimizada e validada para a determinação de clorotalonil, parationa-metílica, clorpirifós, tiametoxam, procimidona, endossulfam, iprodiona, λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina em alface por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG-DCE).

Esta técnica consiste na extração de 4,0000 g de amostra com 1,0 mL de água, 6,5 mL de acetonitrila e 1,5 mL de acetato de etila . Essa solução é mantida em agitação mecânica por 10 minutos. Posteriormente a mistura é centrifugada por 3 minutos a 1200 g e em seguida é levada ao freezer a aproximadamente -20 °C por 3 horas. Após esse período, o extrato é passado por um papel de filtro contendo 1,5000 g de sulfato de sódio anidro. Retira-se 1,5 mL da fase orgânica e analisa-se o extrato por CG-DCE.

Os parâmetros avaliados no processo de validação, tais como: seletividade, linearidade de resposta do método, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão indicaram que a metodologia ESL-PBT é eficiente para a extração da maioria dos agrotóxicos estudados em alface, com limites de quantificação abaixo dos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pela União Européia, Anvisa e Codex Alimentarius para estes agrotóxicos neste tipo de matriz, com exceção à parationa-metílica e ao tiametoxam.

As diferentes etapas de *clean-up* testadas não foram eficientes na remoção do pigmento e dos co-extrativos, com exceção da etapa com carvão ativado, que limpou o extrato, mas também removeu boa parte dos analitos.

No estudo da estabilidade dos compostos no solvente, observou-se que os analitos permetrina e procimidona, são bastante estáveis em acetonitrila tanto quando armazenado em freezer quanto exposto ao ambiente. Já os outros compostos tiveram um comportamento de maior instabilidade.

Quanto ao estudo da estabilidade dos compostos no extrato da matriz, conclui-se que a degradação dos co-extrativos ao longo do período de monitoramento espectrofotométrico, não influenciou na estabilidade dos analitos na solução.

Em relação ao efeito de matriz, agrotóxicos como clorotalonil, clorpirifós, tiametoxam, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina sofreram efeito de matriz positivo, ou seja, os co-extrativos provocaram um aumento da resposta cromatográfica para estes compostos. Já agrotóxicos como a procimidona, endossulfam e iprodiona, sofreram efeito de matriz negativo tendo suas respostas diminuídas quando analisadas no extrato da matriz.

A metodologia ESL-PBT otimizada e validada para extração de resíduos de agrotóxicos em amostras de alface e análise por CG-DCE resultou em um método simples, eficaz, com baixo consumo de solvente e de baixo custo, mostrando-se viável para a determinação dos onze agrotóxicos em alface com porcentagens de recuperação maiores que 57,0% e menores que 103,0%. A técnica foi aplicada para análise residual de quatro agrotóxicos, clorotalonil, tiametoxam, procimidona e iprodiona, onde foi feito o monitoramento da persistência destes compostos em alface durante o intervalo de segurança de cada produto. Pelos resultados obtidos, conclui-se que é muito importante a aplicação das boas práticas agrícolas, respeitando sempre o período de carência de cada produto para garantir a qualidade do alimento que chega até o consumidor.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT – SISTEMAS DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. **Insetos e Doenças.** Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 out. 2010.

AGROLINK. **Problemas.** Disponível em: <http://agrolink.com.br/agricultura/problemas/busca/pulgao-verde_327.html>. Acesso em: 20 out. 2010.

AHMADI, F.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, S. M. R. M.; REZAEI, M. Determination of organophosphorus pesticides in water samples by single drop microextraction and gas chromatography-flame photometric detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1101, p. 307-312, 2006.

ALVES, R. D. A. **Otimização e validação de metodologia para determinação de aldicarbe e carbofurano em amostras de café bebida.** 133 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

AMVRAZI, E. G.; TSIROPOULOS, N. G. Application of single-drope microextraction coupled with gas chromatography for the determination of multiclass pesticides in vegetables with nitrogen-phosphorus and electron-capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2789-2797, 2009.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning

and “dispersive solid-phase extraction” for determination of pesticides residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. BRASIL. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução, n. 899, 2003.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Controlando agrotóxicos nos alimentos**. Relatório de atividades 2001-2004, Brasília, DF, 2005.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Monografias de agrotóxicos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia?tax=Agrotoxicos+e+Toxicologia&cat=Monografias+de+Agrotoxicos&siteArea=Agrotoxicos+e+Toxicologia&pagedesign=Agrotoxico_Toxicologia_N2&WCM_GLOBAL_CONTEXT=/wps/wcm/connect/Anvisa/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia>. Acesso em: 07 jan. 2011.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Relatório de atividades 2001-2007**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/38cffe804067a7c8833ceb137b78f2dc/relatorio+2001+2007.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 20 nov. 2010a.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Relatório de atividades de 2008**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c66e25804067a87e8345eb137b78f2dc/nota+tecnica+-+resultados+para+2008.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 15 out. 2010b.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Relatório de atividades de 2009. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d214350042f576d489399f536d6308db/RELAT%C3%93RIO+DO+PARA+2009.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 10 dez. 2010c.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resíduo de agrotóxicos em alimentos. **Revista Saúde Pública**, v. 40, n. 2, p. 361-363, 2006.

BALINOVA, A.; MLADENOVA, R.; SHTEREVA, D. Solid-phase extraction on sorbents of different retention mechanisms followed by determination by gas chromatography-mass spectrometric and gas chromatography-electron capture detection of pesticide residues in crops. **Journal of Chromatography A**, v. 1150, p. 136-144, 2007.

BARRIADA-PEREIRA, M.; SERÔDIOS, P.; GONZÁLEZ-CASTRO, M. J.; NOGUEIRA, J. M. F. Determination of organochlorine pesticides in vegetable matrices by stir bar sorptive extraction with liquid desorption and large volume injection-gas chromatography-mass spectrometry towards compliance with European Union directives. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 119–126, 2010.

BIZIUK, M.; PRZYIAZNY, A.; CZERWINSKI, J.; WIERGOWSKI, M. Occurrence and determination of pesticides in natural and treated waters. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 103-123, 1996.

BJOËRKLUND, E.; NILSSON, T. Pressurised liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 7, 2000.

CHEMSPIDER. **Database of Chemical Structures and Property Predictions**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com>>. Acesso em: 17 jan. 2011.

CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticides Residues in Food and Feed**. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/pesticides/index.html#P>>. Acesso em: 07 jan. 2011.

COGO, J. P. **Determinação de resíduos de pesticidas em plantas de arroz empregando QuEChERS modificado e CG-ECD.** 93 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2008.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia.** 1. ed. Campinas, SP: Unicamp, 2006. 453p.

COSTA, E. H. da. **Análise multirresíduos de agrotóxicos em abacaxi por cromatografia gasosa.** 108 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Agrotóxicos: Mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.

DARDENGO, R. P. **Extração e análise multirresíduo de inseticidas em batata (*solanum tuberosum* L.).** 107f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

ERNEY, D. R.; GILLESPIE, A. M.; GILVYDIS, D. M. Polymer-coated cation exchangers in high-performance ion chromatography: preparation and application. **Journal of Chromatography A**, v. 638, p. 57, 1993.

ESKILSSON, C. S.; BJOËRKJUND, E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 227-250, 2000.

FARIA, A. M.; MALDANER, L.; SANTANA, C. C.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C.H. Poly(methyltetradecylsiloxane) immobilized onto silica for extraction of multiclass pesticides from surface waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 582, p. 34-40, 2007.

FENOLL, J. HELLIN, P.; LOPEZ, J.; GONZALES, A.; FLORES, P. Simplified multiresidue method for determination of pesticide residues in lettuce by gas

chromatography with nitrogen-phosphorus detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 643-651, 2007a.

FENOLL, J.; HELLIN, P.; LOPEZ, J.; GONZALEZ, A.; FLORES, P. Determination of pesticide residues in lettuce by gas chromatography with electron-capture detection. **Journal of AOAC International**, v. 90, n. 6, 2007b.

FILGUEIRA F. A. R. **Novo manual de agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 412 p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, MG: UFV, 2000.

FRIGGI, C. A. **Avaliação de um modulador a ar comprimido para CG x CG e sua aplicação para determinação de resíduos de pesticidas piretróides em uvas**. 107 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2008.

GALLI, A; SOUZA, D; GARBELLINI, G. S; COUTINHO, C. F. B; MAZO, L. H; ACALA, L. A; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de agrotóxicos em alimentos. **Química Nova**, v.29 , n.1, 2006.

GELSOMINO, A.; PETROVICOVÁ, B.; TIBURTINI, S.; MAGNANI, E.; FELICI, M. Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gel permeation chromatography followed by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 782, p. 105-122, 1997.

GOULART, S. M. **Extração de deltametrina e cipermetrina de leite e análise por cromatografia gasosa**. 60f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

GOULART, S. M.; ALVES, R.D.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J.H.; ASSIS, T. C.; QUEIROZ, M. E. L. R. Optimization and validation of liquid-liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water.

Analytical Chimica Acta, v. 671, p. 41-47, 2010.

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, p. 1320-1323, 2008.

HAJSLOVÁ, J.; HOLADOVÁ, K.; KOCOUREK, V.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; CUHRA, P.; KEMPNÝ, M. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatography analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 800, p. 283-295, 1998.

HAJSLOVÁ, J.; ZROSTLÍKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra) trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 181-197, 2003.

HENZ, G. P.; SUINAGA, F. Tipos de alface cultivados no Brasil. **Embrapa Hortaliças**, Brasília, DF, v. 75, n. 1414-9850, Novembro, 2009.

HERCEGOVÁ, A.; DÖMÖTÖROVÁ, M.; MATISOVÁ, E.; Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 54-73, 2007.

HYÖTYLÄINEN, T. Principles, developments and applications of on-line coupling of extraction with chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 14-28, 2007.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo agropecuário, 2006.** Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2006.pdf>. Acesso em: 22 out. 2010.

ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, Q2B

(CPMP/ICH/281/95), 1995.

IMOTO, M. N. **Validação de método multirresíduos para agrotóxicos organohalogenados em maçã por cromatografia gasosa com captura de elétrons (CG/ECD) e cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG/MS)**. 114 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2004.

INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008, 2003.

INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008, 2010.

IUPAC FOOTPRINT – INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Pesticides Properties Database**. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/205.htm>>. Acesso em: 17 jan. 2011.

JIANG, H.; ADAMS, C. A.; KOFFSKY, W. Determination of chloro-s-triazines including didealkylatrazine using solid-phase extraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1064, p. 219-226, 2005.

JORGENSON, J. L. Aldrin and dieldrin: A review of research on their production, environmental deposition and fate, bioaccumulation, toxicology, and epidemiology in the United States. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 113-139, 2001.

KLOTZ, W. L.; SCHURE, M. R.; FOLEY, J. Determination of octanol-water partition coefficients of pesticides by microemulsion electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 930, p. 145-154, 2001.

KRISTENSON, E. M.; RAMOS, L.; BRINKMAN, U. A. Recent advances in

matrix solid-phase dispersion. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 96-111, 2006.

LAMBROPOULOU D. A.; ALBANIS, T. A. Headspace solid phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in strawberry and cherry juices. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, p. 3359-3365, 2002.

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. Ed. Manole, São Paulo, SP, 1999. 230 p.

LEHOTAY, S. J. Supercritical fluid extraction of pesticides in food. **Journal of Chromatography A**, v. 785, p. 289, 1997.

LEHOTAY, S. J.; TOVSKÁ, K. I.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, 2005.

LIMA, F. J. C.; MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S.; TANAKA, S. M. C. N. Inseticida organofosforado metamidofós: aspectos toxicológicos e analíticos. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 11, p. 17-34, 2001.

MARTEL, S. **Comparação dos métodos de extração Quechers e Mini-Luke modificados na determinação de resíduos de pesticidas piretróides em tomate empregando CG x CG – μ ECD**. 139f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2008.

MAŠTOVSKÁ, K.; HAJŠLOVÁ, J.; LEHOTAY, S. J. Ruggedness and other performance characteristics of low-pressure gas chromatography–mass spectrometry for the fast analysis of multiple pesticide residues in food crops. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 335-349, 2004.

MAŠTOVSKÁ, 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, n. 2, p. 259-272, 2004.

MATKOVICH, C. E.; CHRISTIAN, G. D. Salting-out of acetone from water basis of a new solvent extraction system. **Analytical Chemistry**, v. 45, p. 1915-1921, 1973.

MELLO, J. C.; DIETRICH, R.; MEINERT, E. M.; TEIXEIRA, E.; AMANTE, E. R. Efeito do cultivo orgânico e convencional sobre a vida-de-prateleira de alface americana (*Lactuca sativa L.*) minimamente processada. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v. 23, n. 3, p. 418-426, 2003.

MILLER, J. C.; MILLER, J. N. **Statistics for Analytical Chemistry**, Ellis Horwood, New York, 1993.

MISTURA, C. M. **Validação de metodologia para determinação de resíduos de pesticidas organoclorados em sedimentos do lago da barragem Capingui, RS empregando CG-ECD e CG-MS**. 208f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2003.

NEDELKOSKA, T. V.; LOW, G. K. C. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, p. 145-153, 2004.

OLIVEIRA, A. C. B.; SEDIYAMA, M. A. N.; PEDROSA, M. W.; GARCIA, N. C. P.; GARCIA, S. L. R. Divergência genética e descarte de variáveis em alface cultivada sob sistema hidropônico. **Acta Scientiarum**, Maringá, SP, v. 26, n. 2, p. 211-217, 2004.

OVIEDO, M. T. P.; TOLEDO, M. C. F.; VICENTE, E. Resíduos de agrotóxicos piretróides em hortaliças. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 9-18, 2003.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PATERSON, B.; COWIE, C. E.; JACKSON, P. E. Determination of phenols in environmental waters using liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography A**, v. 731, p. 95-102, 1996.

PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: Na overview. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 23, p. 45-85, 2004.

PICÓ, Y.; FERNÁNDEZ, M.; RUIZ, M. J.; FONT, G. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food an environment. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 117-131, 2007.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Pesticide determination in tomatoes by solid-liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 121, p. 251-256, 2010.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n. 4; p. 987-995, 2009.

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

PUSSENTE, I. G. **Extração sólido-líquido e partição em baixa temperatura de clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina em maçã e análise por cromatografia gasosa.** 62f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) –

Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

RAMOS, L.; KRISTENSON, E. M.; BRINKMAN, U. A. T. Current use of pressurized liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 3-29, 2002.

RIAL-OTERO, R.; GASPAR, E. M.; MOURA, I.; CAPELO, J.L. Chromatographic based methods for pesticide determination in honey: An overview. **Talanta**, v.71, p. 503-514, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RISSATO, S.R.; GALHIANE, M. S.; SOUZA, A. G.; APON, B. M. Development of a supercritical fluid extraction method for simultaneous determination of organophosphorus, organohalogen, organonitrogen and pyrethroids pesticides in fruit and vegetables and its comparison with a conventional method by GC-ECD and GC-MS. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 5, p. 1038-1047, 2005.

RIVAS, I. P.; GIL-ALEGRE, M. E.; TORRES-Suárez, A. I. Development and validation of a fast high-performance liquid chromatography method for the determination of microencapsulated pyrethroid pesticides. **Analytical Chimica Acta**, v. 557, p. 245-251, 2006.

RIZOS, C. L.; AVRAMIDES, E. J.; VISI, E. Determination of residues of endosulfan and Five pyrethroid insecticides in virgin olive oil using gás chromatography with electron-capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 297-304, 2001.

SANCHEZ-BRUNETE, C.; ALBERO, B.; MARTIN, G.; TADEO, J. L. Determination of pesticide residues by GC-MS using analyte protectants to counteract the matrix effect. **Analytical Science**, v. 21, p. 1291-1296, 2005.

SCHENCK, F. J.; LEHOTAY, S. J. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatography analysis of pesticide residues in food? **Journal of Chromatography A**, v. 868, p. 51-61, 2000.

SILVA, E. C. da. **Estudos genéticos relacionados à adaptação da alface (*Lactuca sativa* L.) sob altas temperaturas em cultivo protegido na região norte fluminense**. 70 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro RG, 1997.

SMITH, R. M. Before the injection-modem methods of sample preparation for separation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 3-27, 2003.

SOUZA, P.A.; NEGREIROS, M.Z.; MENEZES, J.B.; BEZERRA NETO, F.; SOUZA, G.L.F.M.; CARNEIRO, C.R; QUEIROGA, R.C.F. Características químicas de alface cultivada sob efeito residual da adubação com composto orgânico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, n.3, p. 754-757, 2005.

SUCHAN, P.; PULKRABOVÁ, J.; HAJŠLOVÁ, J.; KOCOUREK, V. Pressurized liquid extraction in determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in fish samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 520, p. 193-200, 2004.

THOMPSON, M.; STEPHEN, L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 835, 2002.

UNIÃO EUROPEIA. **Pesticides EU-MRLs**. Disponível em: <http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm>. Acesso em: 07 jan. 2011.

UNICAMP – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela&PHPSESSID=d65493a83bcb2e6110cea7867af2abe2>> . Acesso em: 15 nov. 2010.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1278-1287, 2009.

VIANA, E.; MOLT, J.C.; FONT, G. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the analysis of pesticide residues in vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 437-444, 1996.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, n. 3, 2007.

YURI, J. E.; MOTA, J. H.; SOUZA, R. J. de; RESENDE, G. M. de; FREITAS, S. A. C. de; RODRIGUES JÚNIOR, J. C. **Alface americana: cultivo comercial**. Lavras, MG: UFLA, 2002. 51 p.

ZROSTLÍKOVÁ, J.; HAJŠLOVÁ, J. Matrix effects in (ultra) trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 181-197, 2003.