

**ALESSANDRA APARECIDA ZINATO RODRIGUES**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO  
LÍQUIDO – LÍQUIDO COM PARTIÇÃO INDUZIDA POR SAL  
PARA ANÁLISE DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA  
POR CROMATOGRAFIA GASOSA E APLICAÇÕES**

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  
2010

**ALESSANDRA APARECIDA ZINATO RODRIGUES**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO  
LÍQUIDO – LÍQUIDO COM PARTIÇÃO INDUZIDA POR SAL  
PARA ANÁLISE DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA  
POR CROMATOGRAFIA GASOSA E APLICAÇÕES**

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: 12 de fevereiro de 2010.

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Eliana L. R. de Queiroz  
(Coorientadora)

---

Prof. Carlos Roberto Bellato  
(Coorientador)

---

Prof. Anízio Márcio de Faria

---

Prof. André Fernando de Oliveira

---

Prof. Antônio Augusto Neves  
(Orientador)

*“Rezar como se tudo dependesse apenas  
de Deus e trabalhar como se tudo  
dependesse apenas de você”.*

*S<sup>ta</sup> Terezinha*

*À Deus,  
Aos meus pais João e Olímpia,  
Aos meus irmãos Giovane e Gislene,  
Ao meu noivo José Mariano,  
Com amor, dedico.*

*“O valor das coisas não está no tempo que  
elas duram, mas na intensidade com que  
acontecem. Por isso, existem momentos  
inesquecíveis, coisas inexplicáveis,  
pessoas incomparáveis”.*

*Fernando Pessoa*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meus passos, pela presença constante em todos os momentos da minha vida e por me conceder mais esta bênção.

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

Agradeço de todo coração por ter convivido com pessoas tão especiais como os professores: Antônio Augusto Neves e Maria Eliana Lopes Ribeiro. Agradeço pela amizade, incentivo, ensinamentos transmitidos e também pelo voto de confiança.

Aos professores Carlos Roberto Bellato, Anízio Márcio de Faria e André Fernando de Oliveira pela participação na banca.

Ao meu noivo José Mariano, amigo, companheiro de todas as horas. Obrigada por todo apoio, amor, paciência, enfim por sempre acreditar na minha capacidade e por confiar que chegaremos muito além de nossos sonhos.

Aos meus pais, João e Olímpia, pelo amor, incentivo, ensinamentos e preces que ajudaram a nutrir as minhas forças e vencer todos os obstáculos que surgiram nesta missão.

Aos meus irmãos, Gislene e Giovane, pelo carinho, amizade e apoio.

Aos amigos do laboratório de química analítica (LAQUA) com os quais convivi durante este tempo: Ana Isabel, Ana Cláudia, Armanda, Bia, Carlos, Carol, Elenice, Elisa, Fernanda, Flaviane, Gevany, Juliana, Kamila, Lidiane, Lívia, Luciana, Luís Manoel, Maria Antônia, Renata, Rose, Simone e Soraia. Tenho um carinho muito grande por todos.

Aos técnicos Ricardo e José Luís, pela amizade, paciência e pela disposição em ajudar sempre que se fez necessário.

A todos os estagiários, funcionários, colegas e professores da Universidade Federal de Viçosa, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho. Meu muito obrigado por tudo.

## **BIOGRAFIA**

ALESSANDRA APARECIDA ZINATO RODRIGUES, filha de João Medeiros Rodrigues e Olímpia Maria Zinato Rodrigues, nasceu em Viçosa, Minas gerais, em 07 de março de 1975.

Em março de 1997, iniciou o Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Laticínios, pela Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se como bacharel em março de 2001.

Em março de 2008, iniciou o curso de pós-graduação em Agroquímica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em fevereiro de 2010.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABELAS .....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xviii
INTRODUÇÃO .....	1
CAPÍTULO 1- EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO E PARTIÇÃO INDUZIDA POR SAL .....	3
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
1.1.1 Agrotóxicos .....	4
1.1.1.1 Agrotóxicos, saúde e meio ambiente .....	4
1.1.1.2 Cinética dos agrotóxicos .....	6
1.1.1.3 Toxicidade dos agrotóxicos .....	7
1.1.2 Água: uma preocupação Mundial .....	9
1.1.2.1 Monitoramento da qualidade das águas .....	9
1.1.2.2 Legislação .....	12
1.1.3 Agrotóxicos selecionados para estudo .....	14
1.1.3.1 Piretróides .....	14
1.1.3.2 Organofosforados .....	17
1.1.3.3 Neonicotinóides .....	19
1.1.4 Técnicas de extração de resíduos agrotóxicos em alimentos e amostras ambientais .....	22
1.1.4.1 Partição induzida por sal ( <i>salting out</i> ).....	26
1.1.5 Métodos de análise de agrotóxicos .....	29
1.1.6 Validação do método analítico .....	30
1.2 OBJETIVOS.....	33
1.2.1 Objetivo Geral .....	33
1.2.2 Objetivos específicos .....	33
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
1.3.1 Reagentes e equipamentos .....	34
1.3.2 Preparo de soluções padrão .....	34
1.3.3 Preparo de soluções padronizadas de deltametrina e cipermetrina a partir de produtos comerciais .....	35
1.3.4 Preparo de amostras de água fortificadas.....	36

1.3.5	Limpeza do material utilizado .....	36
1.3.6	Otimização da técnica Extração Líquido-Líquido com Partição Induzida por Sal (ELL-PIS) .....	36
1.3.6.1	Avaliação da eficiência da mistura extratora água /acetona/ acetato de etila na recuperação dos agrotóxicos .....	36
1.3.6.2	Efeito da concentração salina.....	38
1.3.6.3	Influência da forma e tempo de agitação na porcentagem de recuperação dos analitos .....	38
1.3.6.4	Planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> .....	38
1.3.7	Análise Cromatográfica .....	40
1.3.8	Validação do método analítico .....	40
1.3.8.1	Seletividade .....	41
1.3.8.2	Linearidade de resposta do detector .....	41
1.3.8.3	Limite de detecção e quantificação do método extração líquido-líquido com partição induzida por sal (ELL-PIS) .....	42
1.3.8.4	Precisão .....	43
1.3.8.4.1	Repetitividade .....	43
1.3.8.4.2	Precisão intermediária .....	43
1.3.8.5	Exatidão .....	43
1.3.8.5.1	Ensaio de recuperação .....	44
1.3.8.5.2	Comparação de métodos .....	44
1.3.9	Determinação dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam deltametrina e cipermetrina em amostras naturais e avaliação do efeito de matriz .....	45
1.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
1.4.1	Análise Cromatográfica .....	48
1.4.2	Otimização da técnica de Extração Líquido-Líquido com Partição Induzida por Sal (ELL-PIS) .....	49
1.4.2.1	Avaliação da eficiência da mistura extratora água/ acetona/ acetato de etila na recuperação dos agrotóxicos .....	49
1.4.2.2	Valores de Recuperação dos agrotóxicos sob efeito da concentração salina .....	51
1.4.2.3	Efeito da forma e tempo de agitação das amostras na porcentagem de extração dos analitos das amostras de água .....	53
1.4.2.4	Planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> .....	55
1.4.3	Metodologia otimizada para extração de agrotóxicos em água ..	60
1.4.4	Validação do método analítico.....	60
1.4.4.1	Seletividade .....	61
1.4.4.2	Linearidade de resposta do detector e limite de detecção e quantificação do aparelho .....	62
1.4.4.3	Limite de detecção e limite de quantificação do método (ELL-PIS) .....	64

1.4.4.4	Precisão .....	68
1.4.4.4.1	Repetitividade .....	68
1.4.4.4.2	Precisão intermediária .....	69
1.4.4.5	Exatidão .....	70
1.4.4.5.1	Ensaio de recuperação .....	70
1.4.4.5.2	Comparação de métodos .....	72
1.4.5	Análise de amostras superficiais e avaliação do efeito de matriz .....	73
1.4.6	Método otimizado e validado para extração de agrotóxicos em água.....	76
CAPITULO 2 - ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ÁGUAS DE LAVAGEM DE FRUTAS E HORTALIÇAS E NOS FRUTOS <i>IN NATURA</i> .....		78
2.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	78
2.1.1	Monitoramento de alimentos .....	78
2.1.2	Lavar os alimentos retira-se os agrotóxicos? .....	81
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	85
2.2.1	Reagentes e equipamentos .....	85
2.2.2	Preparo de soluções padrão .....	86
2.2.3	Amostragem .....	86
2.2.4	Aplicação do método ELL-PIS em águas de lavagem de frutas e hortaliças e análise de resíduos de agrotóxicos por CG-DCE .....	86
2.2.5	Adaptação do método ELL-PIS para análise de frutas e hortaliças <i>in natura</i> .....	87
2.2.6	Curva analítica preparada em solvente puro .....	87
2.2.7	Curva analítica preparada no extrato da matriz (branco) .....	88
2.2.8	Quantificação dos resíduos de agrotóxicos presentes no extrato da água de lavagem e nos extratos dos frutos <i>in natura</i> .....	89
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	90
2.3.1	Análise da água de lavagem de frutas e hortaliças pelo método ELL- PIS e determinação por cromatografia gasosa .....	90
2.3.2	Adaptação do método ELL-PIS para análise de frutas e hortaliças .....	92
2.3.3	Curva analítica preparada em solvente puro e no extrato da matriz (Método de adição de padrão) .....	95
2.3.4	Resíduos de agrotóxicos presentes no extrato da água de lavagem de frutas e hortaliças e no fruto <i>in natura</i> .....	104
CONCLUSÕES .....		108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		109
ANEXOS .....		122

## RESUMO

RODRIGUES, Alessandra Aparecida Zinato, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Otimização e validação da técnica de extração líquido – líquido com partição induzida por sal para análise de agrotóxicos em amostras de água por cromatografia gasosa e aplicações.** Orientador: Antônio Augusto Neves. Co-orientadores: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e Carlos Roberto Bellato.

Na etapa de otimização da técnica de extração líquido-líquido com partição induzida por sal (ELL-PIS) para análise de agrotóxicos em água foram feitos testes preliminares avaliando as melhores condições de extração e análise dos mesmos. Posteriormente, as melhores respostas foram utilizadas como referência para um planejamento experimental  $2^3$  para avaliar o comportamento simultâneo dos fatores: proporção entre amostra:solvente extrator, concentração salina, tempo e forma de agitação. À mistura em fase única, composta de água e solvente extrator foi acrescentado 1,0 mL de solução salina (NaCl) com a finalidade de separar as fases. As misturas foram agitadas, deixadas em repouso e a fase orgânica superior contendo os agrotóxicos de interesse foi separada adicionando padrão interno, e ajustando o volume para 5,0 mL. O método ELL-PIS otimizado foi validado para algumas figuras de mérito: seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação do aparelho e do método, precisão e exatidão. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método foram 0,15 e 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o clorpirifós, 5,5 e 18,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o tiametoxam, 1,5 e 5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para cipermetrina e 3,7 e 12,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a deltametrina, respectivamente. A taxa de recuperação obtida para o método proposto variou de 75 a 90%, com desvio-padrão relativo inferior a 10 %. Os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) para as curvas analíticas dos quatro pesticidas foram superiores a 0,99, na faixa de concentração utilizada. O método ELL-PIS depois de validado foi aplicado em amostras de água, não sendo detectada a presença de nenhum dos quatro agrotóxicos nestas amostras. O método de

extração e análise foi aplicado também em amostras de água de lavagem de frutos e hortaliças (morango, maçã, tomate e pimentão) bem como da polpa dos mesmos. Foram encontrados resíduos do princípio ativo tiametoxam, tanto na água como na polpa do morango, maçã, pimentão e tomate, em valores acima do LMR estabelecido pela ANVISA. Também foram detectados resíduos de cipermetrina e clorpirifós no morango e bifentrina na maçã, sendo que estas substâncias não são permitidas para estas culturas. Os resultados apresentados nesta etapa do trabalho mostraram que a higienização convencional de um alimento com água não reduz completamente os níveis residuais de agrotóxicos presentes nas frutas e hortaliças.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Alessandra Aparecida Zinato, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2010. **Optimization and validation of the liquid-liquid extraction with salt induced partitioning technique for analysis of pesticides in water samples by gas chromatography and applications.** Advisor: Antônio Augusto Neves. Co-advisors: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz and Carlos Roberto Bellato.

In the stage of optimizing the liquid-liquid extraction with salt induced partitioning technique (LLE-SIP) for analysis of pesticides in water, preliminary tests were performed to evaluate the best conditions for their extraction and analysis. Later, the best responses were used as reference for a  $2^3$  experimental planning to evaluate the simultaneous behavior of the following factors: sample proportion, solvent extractor, saline concentration and form of agitation. To a single phase mixture composed of water and solvent extract, 1.0 mL of a saline solution (NaCl) was added to separate the phases. The mixtures were agitated, left in repose, and the upper organic phase containing the pesticides of interested was separated, followed by addition of an internal standard and volume adjustment. The optimized LLE-SIP method was validated for some figures of merit: selectivity, linearity, detection and quantification limits of the device and method, precision and accuracy. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of the method were 0.15 and  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  for chlorpyrifos, 5.5 and  $18.2 \mu\text{g L}^{-1}$  for thiamethoxam, 1.5 and  $5.0 \mu\text{g L}^{-1}$  for cypermethrin and 3.7 and  $12.0 \mu\text{g L}^{-1}$  for deltamethrin, respectively. The rate of recovery obtained for the proposed method varied from 75 to 90%, with relative standard deviation less than 10%. Coefficients of determination ( $r^2$ ) for the analytical curves of the four pesticides were greater than 0.99 in the utilized concentration range. The LLE-SIP method, after validation, was applied to water samples, not detecting the presence of any of the four pesticides in these samples. The methods of extraction and analysis were also applied to water samples from washing of fruits

and vegetables (strawberry, apple, tomato and green pepper) as well as their pulps. Residues of the active principle thiamethoxam were encountered both in the water as well as the pulp of strawberry, apple, green pepper and tomato, in values greater than the maximal residue levels established by the ANVISA. Cypermethrin and chlorpyrifos were also detected in strawberries and bifenthrin was detected in apples, despite these substances not being permitted for these specific crops. The results presented in this stage of work showed that conventional washing of a food with water does not completely reduce the residual levels of pesticides present in fruits and vegetables.

## LISTAS DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b>	Principais rotas de transporte e degradação de agrotóxicos no ambiente.....	7
<b>Figura 1.2</b>	Fórmula estrutural e nome químico dos piretróides – (A) cipermetrina, (B) deltametrina e (C) bifentrina.....	16
<b>Figura 1.3</b>	Fórmula química do agrotóxico clorpirifós.....	18
<b>Figura 1.4</b>	Fórmula estrutural do agrotóxico tiametoxam.....	20
<b>Figura 1.5</b>	Fórmula estrutural do composto obtido da degradação do clorpirifós.....	21
<b>Figura 1.6</b>	Fluxograma das etapas do processo de validação.....	32
<b>Figura 1.7</b>	Cromatograma de uma solução padrão de 100,0 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) dos princípios ativos em acetonitrila, onde: $t_R = 5,7$ min: clorpirifós, $t_R = 5,9$ min: tiametoxam, $t_R = 8,3$ min: bifentrina (PI) $t_R = 10,9$ min: cipermetrina e $t_R = 13,2$ min: deltametrina.....	49
<b>Figura 1.8</b>	Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina com adição de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mol $\text{L}^{-1}$ de solução salina durante o processo de extração.....	52
<b>Figura 1.9</b>	Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina de amostras de água em função do processo de homogeneização (V = vórtex, MA = mesa agitadora e US = ultrassom) da mistura após rompimento do equilíbrio pela adição de solução salina.....	54
<b>Figura 1.10</b>	Diagramas para interpretação geométrica dos efeitos de interação observados no planejamento $2^3$ .....	59
<b>Figura 1.11</b>	A) cromatograma do extrato obtido da matriz água do Rio	

	Manhuaçu e B) Cromatograma da amostra de água do Rio Manhuaçu fortificada com 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos agrotóxicos clorpirifós ( $t_R = 5,7$ min), tiametoxam ( $t_R = 5,9$ min), padrão interno ( $t_R = 8,3$ min), cipermetrina ( $t_R = 10,9$ min) e deltametrina ( $t_R = 13,2$ min).....	62
<b>Figura 1.12</b>	Correlação entre as respostas do detector e as concentrações das soluções de clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina em acetonitrila.....	63
<b>Figura 1.13</b>	Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de LD e LQ.....	65
<b>Figura 1.14</b>	Curvas analíticas dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina obtidos da aplicação da técnica ELL-PIS em amostras de água e análise por CG-DCE.....	68
<b>Figura 1.15</b>	A) cromatograma do extrato obtido da matriz água do Rio Matipó, B) Cromatograma da amostra de água do Rio Matipó fortificada com os princípios ativos clorpirifós ( $t_R = 5,7$ min), tiametoxam ( $t_R = 5,9$ min), padrão interno ( $t_R = 8,3$ min), cipermetrina ( $t_R = 10,9$ min) e deltametrina ( $t_R = 13,2$ min).....	76
<b>Figura 2.1</b>	Esquema do método de adição padrão aplicado aos extratos de morango, maçã, pimentão e tomate (com e sem <i>clean-up</i> ).....	88
<b>Figura 2.2</b>	Cromatogramas (A, B, C, D) dos extratos obtido da matriz água isenta de agrotóxicos ( ___ ) e cromatogramas (A, B, C, D) de extratos obtidos da água de lavagem de maçã, morango, pimentão e tomate respectivamente ( ___ ) após análise pelo método ELL- PIS.....	92
<b>Figura 2.3</b>	(A) Cromatograma obtido do branco da matriz (sem <i>clean-up</i> ) (B) Cromatograma obtido do branco da matriz (com <i>clean-up</i> ).....	94
<b>Figura 2.4</b>	Curvas de adição de padrão dos princípios ativos (A) clorpirifós, (B) tiametoxam, (C) bifentrina (D) cipermetrina e (E) deltametrina preparadas em acetonitrila e em extrato	

	de maçã (com e sem <i>clean-up</i> ).....	97
<b>Figura 2.5</b>	Curvas adição de padrão dos princípios ativos (A) clorpirifós, (B) tiametoxam, (C) bifentrina (D) cipermetrina e (E) deltametrina preparadas em acetonitrila e em extrato de morango (com e sem <i>clean-up</i> ).....	99
<b>Figura 2.6</b>	Curvas adição de padrão dos princípios ativos (A) clorpirifós, (B) tiametoxam, (C) bifentrina (D) cipermetrina e (E) deltametrina preparadas em acetonitrila e em extrato de tomate (com e sem <i>clean-up</i> ).....	101
<b>Figura 2.7</b>	Curvas adição de padrão dos princípios ativos (A) clorpirifós, (B) tiametoxam, (C) bifentrina (D) cipermetrina e (E) deltametrina preparadas em acetonitrila e em extrato de pimentão (com e sem <i>clean-up</i> ).....	102

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b>	Classificação toxicológica de agrotóxicos quanto a periculosidade.....	8
<b>Tabela 1.2</b>	Volumes da matriz água e dos solventes acetonitrila e acetato de etila utilizados na mistura extratora para recuperação dos analitos.....	37
<b>Tabela 1.3</b>	Planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para avaliação de três fatores, F1 - proporção dos solventes da mistura extratora, F2 - força iônica e F3 - tempo de agitação, na porcentagem de extração dos agrotóxicos em amostras de água.....	39
<b>Tabela 1.4</b>	Porcentagem de recuperação média e estimativa do erro experimental, obtidos na análise dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetina e deltametrina dos extratos orgânicos utilizando diferentes proporções entre volumes amostra: volumes da mistura extratora.....	50
<b>Tabela 1.5</b>	Porcentagens de recuperação média e estimativa do erro experimental, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de água contendo os agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina submetido à extração líquido-líquido com partição induzida por sal.....	56
<b>Tabela 1.6</b>	Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores ( $\pm$ estimativa do erro experimental) na extração de cada um dos agrotóxicos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de água.....	57
<b>Tabela 1.7</b>	Valores do tempo de retenção, equação da reta,	

	coeficiente de correlação, faixa de trabalho, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método.....	66
<b>Tabela 1.8</b>	Porcentagens de recuperação (%R), coeficientes de variação, CV (%) obtidos após sete extrações em amostras de água dos agrotóxicos clorpirifós (3,0 µg L <sup>-1</sup> ), tiametoxam (110,0 µg L <sup>-1</sup> ), cipermetrina (30,0 µg L <sup>-1</sup> ) e deltametrina (72,0µg L <sup>-1</sup> ).....	69
<b>Tabela 1.9</b>	Porcentagens de recuperação, (%R), e coeficientes de variação, CV (%), obtidos da aplicação do método ELL-PIS, com sete repetições, em amostras de água fortificadas com os quatro agrotóxicos, em diferentes dias, pelo mesmo analista.....	70
<b>Tabela 1.10</b>	Porcentagens de recuperação (%R) e coeficiente de variação (%CV) obtidos após as extrações das amostras de água fortificadas com os agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina em quatro diferentes concentrações.....	71
<b>Tabela 1.11</b>	Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação (%CV) obtidos após três extrações em amostras de água dos agrotóxicos clorpirifós (3,0 µg L <sup>-1</sup> ), tiametoxam (110,0 µg L <sup>-1</sup> ), cipermetrina (30,0 µg L <sup>-1</sup> ) e deltametrina (72,0µg L <sup>-1</sup> ) usando ELL- PIS e dois métodos de referência.....	72
<b>Tabela 1.12</b>	Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação, CV (%), obtidos de extrações de agrotóxicos em amostras de água destilada e de águas de rios da Zona da Mata mineira fortificada com os princípios ativos clorpirifós (3,0 µg L <sup>-1</sup> ), tiametoxam (110,0 µg L <sup>-1</sup> ), cipermetrina (30,0 µg L <sup>-1</sup> ) e deltametrina (72,0 µg L <sup>-1</sup> ).....	75
<b>Tabela 2.1</b>	Porcentagens de amostras contaminadas por agrotóxicos no período de 2002 a 2008.....	79
<b>Tabela 2.2</b>	Dados consolidados do PARA 2008 para as culturas (maçã, morango, tomate e pimentão).....	80

<b>Tabela 2.3</b>	Resíduos de agrotóxicos provenientes do extrato da água de lavagem de morangos e dos frutos <i>in natura</i> após serem lavados ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e seus respectivos limite máximo de resíduo (LMR).....	104
<b>Tabela 2.4</b>	Resíduos de agrotóxicos provenientes do extrato da água de lavagem de maçãs e dos frutos <i>in natura</i> após serem lavados ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e seus respectivos limite máximo de resíduo (LMR).....	105
<b>Tabela 2.5</b>	Resíduos de agrotóxicos provenientes do extrato da água de lavagem de pimentões e nos frutos <i>in natura</i> após serem lavados ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e seus respectivos limite máximo de resíduo (LMR).....	105
<b>Tabela 2.6</b>	Resíduos de agrotóxicos provenientes do extrato da água de lavagem de pimentões e dos frutos <i>in natura</i> após serem lavados ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e seus respectivos limite máximo de resíduo (LMR).....	106
<b>Tabela 2.7</b>	Características dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina deltametrina.....	122

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CE - Comunidade Européia
- CG - Cromatografia gasosa
- CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
- CV - Coeficiente de Variação
- DCE - Detector por captura de elétrons
- DDT - Dicloro Difenil Tricloroetano
- DL<sub>50</sub> - Dose Letal para 50 % da espécie testada
- DP - Desvio Padrão
- ELL - Extração Líquido-Líquido
- ELL-PBT - Extração Líquido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura
- ELL-PSO - Extração Líquido-Líquido com Partição por “Salting Out”
- EFSC - Extração com Fluido Supercrítico
- EPA - Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
- ICH - International Conference on Harmonisation (Conferência Internacional em Harmonização)
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- ISO - International Organization for Standardization
- IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry
- K<sub>d</sub> - Constante de Distribuição
- K<sub>oc</sub> - coeficiente de sorção
- LAQUA - Laboratório de Química Analítica
- LMR - Limite Máximo de Resíduos
- LD - Limite de Detecção

LQ - Limite de Quantificação  
m/m - massa por massa  
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
MEFS - Microextração em Fase Sólida  
MELL - Microextração Líquido-Líquido  
MS - Ministério da Saúde  
 $\mu\text{g.L}^{-1}$  - Micrograma por Litro  
 $\mu\text{L}$  - Microlitros  
NA - Não autorizado  
ND - Não detectado  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
OPPS - organofosforados  
PARA - Programa de análise de resíduos de Agrotóxicos em alimentos  
pH Potencial de Hidrogeniônico  
 $R^2$  - Coeficiente de determinação  
RENACIAT - Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica  
RSD - Relative Standard Deviation (Desvio Padrão Relativo)  
SINITOX - Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas  
SPE - Solid Phase Extraction (Extração em Fase Sólida)  
SPME - Solid Phase Microextraction (Microextração em Fase Sólida)  
 $t_R$  - tempo de retenção  
VMP - Valor Máximo Permitido  
v/v - volume por volume  
WHO - World Health Organization

## INTRODUÇÃO

Com o crescimento da população mundial e conseqüente necessidade da produção de alimentos, vários tipos de agrotóxicos passaram a ser empregados na agricultura para controle de pragas e doenças, uma vez que contribuem para aumentar a produtividade.

O uso freqüente, e muitas vezes incorreto, de agrotóxicos pode causar a contaminação dos solos, da atmosfera, das águas superficiais e subterrâneas e dos alimentos. Conseqüentemente, podem apresentar efeitos negativos em organismos terrestres e aquáticos e intoxicação humana pelo consumo de água e alimentos contaminados, assim como o risco de intoxicação ocupacional de trabalhadores rurais (SPADOTTO, 2006). Assim, o estudo das características físicas, químicas e biológicas, intrínsecas de cada composto e de cada matriz, torna-se extremamente importante para a identificação de informações sobre a reatividade, toxicidade e mobilidade desses compostos nos diferentes compartimentos ambientais (JARDIM *et al.*, 2009).


Devido ao grande número de princípios ativos utilizados na agricultura, há necessidade de um monitoramento constante da qualidade das águas e dos alimentos, o que tem motivado o desenvolvimento de técnicas analíticas rápidas e eficientes para análise multirresíduo de agrotóxicos em amostras das mais diversas origens. Esses métodos devem ser capazes de detectar os limites máximos de resíduos (LMR) permitidos para cada matriz.

A determinação de resíduos de agrotóxicos nos mais diferentes meios, é tradicionalmente realizada por meio de técnicas cromatográficas devido à facilidade de separação, identificação e quantificação das substâncias presentes na amostra, com utilização de detectores específicos (GALLI *et al.*, 2006). A cromatografia gasosa destaca-se pela disponibilidade de análises rápidas, de baixo custo e que possibilitam a quantificação de um grande número de compostos voláteis ou volatilizáveis simultaneamente.

A determinação de resíduos de agrotóxicos desempenha um papel importante para a estimativa da exposição humana e do meio ambiente a estes compostos, permitindo avaliar a conformidade da produção agrícola com as Boas Práticas Agrícolas, possibilitando decisões regulatórias comerciais visando garantir a segurança alimentar (ANVISA, 2006).

Dentro deste contexto de prevenção e determinação de resíduos de contaminantes em água e alimentos consumidas pela população, este estudo foi conduzido com o objetivo de desenvolver e validar um método multirresíduo para a determinação de agrotóxicos em água por cromatografia gasosa usando detector por captura de elétrons e possível adaptação deste para amostras sólidas.

***CAPÍTULO 1 - Extração Líquido-Líquido  
com Partição Induzida por Sal (ELL-PIS)***



## 1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1.1. Agrotóxicos

Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization*), entidade que faz parte da estrutura da ONU (Organização das Nações Unidas), os agrotóxicos são definidos como:

*“Qualquer substância, ou mistura de substâncias, usadas para prevenir, destruir ou controlar qualquer praga – incluindo vetores de doenças humanas e animais, espécies indesejadas de plantas e de animais, causadoras de danos durante a produção, processamento, estocagem, transporte ou distribuição de alimentos, produtos agrícolas, madeira, e derivados – ou então que possam ser administradas em animais para o controle de insetos, aracnídeos e outras pestes que acometem os corpos dos animais de criação”* (MORAGAS & SCHNEIDER, 2003).

#### 1.1.1.1. Agrotóxicos, saúde e meio ambiente

Evitar perdas na agricultura e garantir alimentos em quantidade e qualidade adequados para uma população em plena expansão tem sido o grande desafio de especialistas de todo o mundo. Fato que contribuiu para a classificação do Brasil como o maior consumidor mundial de agrotóxicos, gerando em 2009 uma receita de US\$ 7 bilhões e um consumo de 700 mil toneladas no país (ANVISA, 2010). De acordo com os dados do IBGE (2008), Minas Gerais é o estado que mais utiliza fertilizantes; e o estado de São Paulo, é o que emprega mais agrotóxicos por hectare plantado (7,62 kg/ha, mais que o dobro da média nacional).

Portanto, os agrotóxicos além de cumprirem o papel de proteger as culturas agrícolas das pragas, doenças e plantas daninhas, também podem oferecer riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Quando um agrotóxico é

aplicado diretamente a um alvo, o ambiente inteiro é afetado (WHO, 2008). O uso freqüente de agrotóxicos, muitas vezes de forma incorreta favorece os riscos de contaminação de diversos compartimentos ambientais, como a contaminação de solos agrícolas, de águas superficiais e subterrâneas e de alimentos, podendo, em episódios mais graves, inviabilizar o consumo destes. (GEBLER, 2004)

Os principais produtos usados comercialmente são compostos orgânicos sintéticos com alta atividade biológica, destacando-se entre estes os inseticidas, fungicidas e herbicidas (SILVA & FAY, 2004). Os agrotóxicos somente podem ser utilizados no país se forem registrados em órgão federal competente, de acordo com as diretrizes e exigências dos órgãos responsáveis pelos setores da saúde, do meio ambiente e da agricultura. Sendo assim no Brasil estes produtos são controlados por três órgãos governamentais: Ministério da Saúde (MS) por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Ministério do Meio Ambiente, através do Instituto Brasileiro do meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (IMA, 2009).

Originalmente, os agrotóxicos possuíam baixa mobilidade e solubilidade e tinham um forte poder de adesão ao solo. Com a evolução tecnológica, os agrotóxicos passaram a ser mais solúveis em água, possuir baixa capacidade de adesão e ser mais voláteis. Essas inovações tecnológicas que eram baseadas na manipulação de compostos químicos criaram agrotóxicos cada vez mais tóxicos, persistentes e eficientes para combater as pragas (VEIGA *et al.*, 2006).

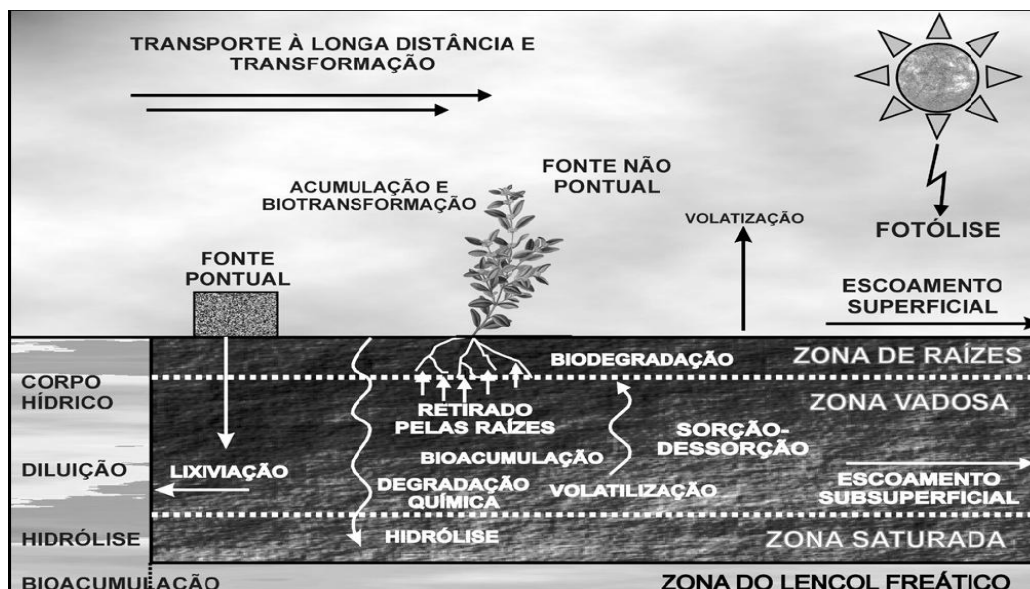
A exposição humana aos agrotóxicos ocorre segundo diferentes rotas, o que dependerá de cada circunstância. Assim, por exemplo, um trabalhador rural pode ser exposto tanto durante a aplicação do agrotóxico, em dada cultura, quanto pelo consumo de alimentos ou água contaminados. Da mesma forma, populações que moram próximas a áreas cultivadas com agrotóxicos podem consumir água ou alimentos contaminados, bem como inalar a substância que eventualmente esteja no ar. Além disso, um mesmo indivíduo pode ser exposto a mais de um tipo de agrotóxico, ainda que segundo uma única rota, configurando-se, também, uma situação preocupante de exposição. (FERNANDES NETO & SARCINELLI, 2009).

### 1.1.1.2. Cinética dos agrotóxicos

Depois da aplicação de um agrotóxico, através dos diferentes métodos, vários processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos determinam seu comportamento. O destino de agrotóxicos no ambiente é governado por processos de retenção (adsorção, absorção), de transformação (degradação química e biológica), de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial), e por interações desses processos (SPADOTTO, 2006).

Características climáticas também desempenham um papel importante na persistência dos agrotóxicos. Estudos no Ártico têm mostrado que os inseticidas e herbicidas podem persistir 3 a 8 vezes mais em climas frios do que nas regiões temperadas (WHO, 2008). O volume, a intensidade e a frequência das chuvas têm uma grande influência no transporte e na perda de agrotóxicos através do escoamento superficial e da percolação da água no solo (SPADOTTO, 2006). A maioria dos agrotóxicos que tem pouca solubilidade em água, como os piretróides, tem tendência de se ligarem fortemente ao solo orgânico, diminuindo a sua movimentação e aumentando a sua estabilidade (Lee *et al.*, 2002).

Além da variedade de processos envolvidos na determinação do destino ambiental de agrotóxicos, diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas, e nas características podem afetar esses processos. A presença de grupos funcionais contendo oxigênio, nitrogênio e enxofre tendem a tornar os compostos orgânicos mais reativos, tanto química quanto biologicamente, mais solúveis em água e menos voláteis quando comparados aos hidrocarbonetos com o mesmo número de carbonos. A presença de halogênios por outro lado torna o composto menos solúvel em água, mais volátil e normalmente menos reativo, tornando-o mais estável ambientalmente (SILVA & FAY, 2004). Na Figura 1.1 são apresentados, esquematicamente, os processos principais que atuam na movimentação e na degradação de agrotóxicos na natureza, ilustrando os meios mais prováveis onde esses compostos podem ser encontrados.



**Figura 1.1** - Principais rotas de transporte e degradação de agrotóxicos no ambiente.

Fonte: (GEBLER, 2004; JARDIM *et al.*, 2009).

Um aspecto importante que tem de ser levado em consideração para o uso com segurança dos agrotóxicos é a ocorrência e persistência dos resíduos destes compostos e de seus metabólitos na cadeia alimentar. Além dos efeitos toxicossistêmicos para os quais são estabelecidas doses limites de exposição, há uma enorme preocupação com os efeitos de longa duração (SARCINELLI *et al.*, 2003).

### 1.1.1.3. Toxicidade dos agrotóxicos

A toxicidade aguda dos agrotóxicos é um dos principais fatores utilizados na classificação, controle e uso destes produtos. De acordo com a relação entre a dose do produto e os efeitos produzidos, os agrotóxicos são divididos em quatro classes de toxicidade (I, II, III e IV).

Assim, para fins de prescrição das medidas de segurança contra os riscos à saúde humana, os produtos comerciais devem ser enquadrados em função da DL<sub>50</sub>, inerente a cada substância. Ela é baseada na dose letal 50 (DL<sub>50</sub>) que é um valor estatístico que determina a quantidade de agrotóxico em mg/kg de peso corporal necessária para matar 50% da amostra populacional em estudos por intoxicações agudas. Os valores são determinados em cobaias e extrapolados para humanos a partir do peso (LEVIGARD, 2001).

Quanto menor o valor de DL<sub>50</sub>, mais potente (i.e, mais tóxico) é o produto químico, já que é requerida uma menor quantidade (miligramas) da substância por quilo vivo do animal teste (BAIRD, 2002). A Tabela 1.1 apresenta um resumo da classificação dos agrotóxicos relacionando os valores de DL<sub>50</sub> para ratos ao grau de toxicidade destes compostos.

**Tabela 1.1 – Classificação toxicológica de agrotóxicos quanto a periculosidade**

Classificação	DL <sub>50</sub> via oral (mg kg <sup>-1</sup> )		DL <sub>50</sub> via dérmica (mg kg <sup>-1</sup> )		CL <sub>50</sub> (inalatória) (**)
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos	
Classe I Extremamente tóxicos	≤ 100	≤ 200	≤ 200	≤ 400	≤ 0,2
Classe II Altamente tóxicos	100 - 500	200 – 2000	200 - 1000	400 - 4000	0,2 - 2,0
Classe III Medianamente tóxicos	500 - 2000	2000 – 6000	1000 - 4000	4000 - 12000	2,0 - 20,0
Classe IV Pouco tóxicos	≥ 2000	≥ 6000	≥ 4000	≥ 12000	≥ 20,0

DL<sub>50</sub> (dose letal para óbito de 50% dos animais teste), nos estudos pela via oral ou dérmica e CL<sub>50</sub> (concentração letal para óbito de 50% dos animais teste) nos estudos de absorção por via respiratória. (\*\*) Expressa em mg L<sup>-1</sup> de ar por 1 h de exposição. Os termos “sólidos” e “líquidos” referem-se ao estado físico do ingrediente ativo testado.

Fonte: (LARINI,1999)

O Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas - SINITOX - criado em 1980 e vinculado à Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ - é responsável pela coleta, compilação, análise e divulgação dos casos de intoxicação e envenenamento registrados pela Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica – RENACIAT. Esta rede atualmente composta de 36 unidades localizadas em 19 estados e no Distrito Federal tem a função de fornecer informação e orientação sobre o diagnóstico, prognóstico, tratamento e prevenção das intoxicações, assim como inferir sobre a toxicidade das substâncias químicas e biológicas e os riscos que elas ocasionam à saúde (BRASIL, 2005)

Foi realizada uma análise descritiva da base de dados do SINITOX referente ao período de 1999 a 2003. Para os casos e óbitos de intoxicação por agrotóxicos, (26.721 casos; 747 óbitos), a maior concentração de óbitos ocorreu na região Sul com relação às intoxicações por agrotóxicos de uso

agrícola e por produtos veterinários (31,3% e 35,9%, respectivamente), na região Sudeste com relação às intoxicações por agrotóxicos de uso doméstico (48,2%) e na região Nordeste com relação às intoxicações por raticidas e por agrotóxicos de modo geral (63,1% e 34,0%, respectivamente) (BOCHNER, 2007).

Um dos fatores que está relacionado com a grande incidência de intoxicações por agrotóxicos é a facilidade de acesso e o grande número de produtos formulados com essas substâncias. Segundo dados da Anvisa, em fevereiro de 2009, mais de 1000 produtos formulados com 446 ingredientes ativos, classificados como agrotóxicos possuíam registro no Brasil.

### **1.1.2. Água: uma preocupação Mundial**

*“O manejo integrado de recursos hídricos baseia-se na percepção da água como uma parte integrante do ecossistema, um recurso natural e bem econômico e social cujas quantidade e qualidade determinam a natureza de sua utilização. Com esse objetivo, os recursos hídricos devem ser protegidos levando-se em conta o funcionamento dos ecossistemas aquáticos e a perenidade do recurso, a fim de satisfazer e conciliar as necessidades de água nas atividades humana. Ao desenvolver e usar os recursos hídricos, deve-se dar a prioridade à satisfação das necessidades básicas e à proteção dos ecossistemas” (CNUMAD, 1992).*

#### **1.1.2.1. Monitoramento da qualidade das águas**

A água é um dos bens mais importantes que a natureza oferece para o homem, já que somos dependentes dela para a maioria das atividades diárias, e, principalmente, para a nossa sobrevivência.

O uso de agrotóxicos na agricultura é uma das principais causas da contaminação de águas superficiais e subterrâneas. Estas contaminações ocorrem principalmente pela ação das águas da chuva e de irrigação que provocam lixiviação, drenagem e escoamento dos praguicidas presentes nas plantações e no solo, que irão atingir correntes de água ou reservatórios. As contaminações destas águas podem resultar em efeitos tóxicos para a fauna e flora aquáticas e, também, para a saúde humana, devido à utilização para

consumo e práticas de lazer (CEREJEIRA *et al.*, 2003).

É importante ressaltar que, em alguns casos, menos de 0,1% da quantidade de pesticidas aplicados alcançam o alvo, enquanto o restante (99,9%) tem potencial para se mover para outros compartimentos ambientais (SABIK *et al.*, 2000). A contaminação de coleções de água superficiais e subterrâneas tem um potencial extremamente poluente, pois se, por exemplo, o local onde for aplicado o agrotóxico for próximo a um manancial hídrico que abasteça uma cidade, a qualidade dessa água captada também poderá estar comprometida (SOARES & PORTO, 2007)

O que se observa em muitos casos são as aspersões sem controle de dosagens, manuseios indevidos dos recipientes, sendo freqüentes as descargas de restos de produtos e lavagens de galões utilizados nas águas naturais. Filizola *et al* (2002) em seu trabalho verificaram a ocorrência ocasional de resíduos de agrotóxicos além do permitido pela legislação nas águas superficiais na região do Guairá - SP, sendo como conseqüência da lavagem de tanques de aplicação e de embalagens de agrotóxicos

Visando uma solução para o crescente problema das embalagens vazias de agrotóxicos foi instaurada no país uma legislação específica: a Lei nº 9.974, de 06 de junho de 2000 (BRASIL, 2000); regulamentada pelo Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002 (BRASIL, 2002). Essa legislação disciplina a destinação final das embalagens vazias de agrotóxicos e determina responsabilidades específicas para todos os elementos relacionados à cadeia de produção e consumo desses produtos no país, envolvendo agricultores, canais de distribuição e vendas dos produtos comerciais, empresas fabricantes e o próprio poder público. Pela legislação, cumpre ao agricultor a responsabilidade de fazer a tríplice lavagem das embalagens vazias e encaminhá-las, com as respectivas tampas, aos estabelecimentos comerciais em que foram adquiridos, ou em centros de recolhimento, dentro do prazo máximo de um ano a partir da data da compra do agrotóxico.

Inúmeros trabalhos vêm destacando a presença de resíduos de agrotóxicos em ambientes aquáticos (VEIGA *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2007; GRUTZMACHER *et al.*, 2008). Estudos realizados por Conte *et al.*, (2000) mostraram a contaminação da bacia experimental do Rio Pardo, região de Botucatu, SP, por cipermetrina. Embora em baixa concentração, essa

contaminação indica que produtos à base de piretróides são de uso comum nesta região, sendo possivelmente, utilizado em doses maiores e com aplicações mais freqüentes que o necessário, uma vez que, mesmo apresentando baixa persistência no meio ambiente, chegam ao rio. Cabrera *et al.* (2008) verificaram que dos 27 pesticidas utilizados na região Sul do estado do RS pelo menos 19 apresentaram risco de contaminação para águas de superfície e subterrâneas.

Sequinatto *et al.* (2006) constataram que a qualidade da água de fluxo de superfície e de consumo humano, oriunda de uma pequena bacia hidrográfica rural de cabeceira e produtora de fumo localizada no distrito de Nova Boêmia, Agudo, RS, estava contaminada com resíduos de agrotóxicos. Dos sete princípios ativos analisados, cinco deles (imidaclopride, atrazina, clomazone, clorpirifós e iprodione) foram encontrados tanto nas águas do arroio como nas fontes utilizadas para o consumo humano. Nas coletas feitas logo após o transplante do fumo, o clorpirifós foi detectado na água em todos os nove pontos de coleta e mostrou ser persistente ao longo do tempo. Bortoluzzi *et al.* (2007) detectaram a presença do clorpirifós até quatro meses após aplicação do produto, ao realizar monitoramentos da qualidade de água em microbacias de Agudo - RS, Arvorezinha - RS e Cristal - RS nos anos 2001/2002.

Os resultados apresentados no estudo realizado por Veiga *et al.* (2006) mostraram que 70% dos pontos de coleta selecionados numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil apresentaram contaminação detectável, o que validou a hipótese de que os agrotóxicos quando aplicados na agricultura podem contaminar os sistemas hídricos superficiais e subterrâneos.

Dores (2004), em seu trabalho de doutorado relata que agrotóxicos vêm sendo determinados, mesmo que em baixas concentrações, em amostras de água subterrânea de diferentes países, tais como Grã-Bretanha, Alemanha, Estados Unidos, Grécia, Bulgária, Espanha, Portugal e Brasil. Estas determinações visam esclarecer problemas pontuais de contaminação e/ou têm objetivos mais abrangentes, nos quais os resultados encontrados são interpretados sob o enfoque de programas de monitoramento de água subterrânea.

Foram relatados contaminações por pesticidas organofosforados (OPPS)

em algumas águas chinesas. Para descrever o estado de contaminação e da distribuição espacial dos OPPS na água de superfície em toda a China, as amostras foram coletadas em mais de 600 sítios localizados nas águas de superfície em sete bacias e três rios principais durante 2003 e 2004 (GAO *et al.*, 2009). Em 2006, Bouwman *et al.*, constataram a presença simultânea de resíduos de piretróides e DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) na água de rios e leite materno humano em uma área endêmica de malária na África do Sul.

A contaminação do ambiente aquático, principalmente das águas superficiais, tem sido documentada no mundo todo e constitui uma das maiores preocupações que tem surgido no que diz respeito à escala local, regional, nacional e global (KONSTANTINO *et al.*, 2006). O conhecimento brasileiro sobre os impactos na qualidade da água subterrânea encontra-se ainda em estágio inicial quando comparado com países como Estados Unidos, Canadá ou Alemanha. A identificação de áreas potencialmente contaminadas ainda é incipiente em nosso país, decorrente de uma histórica falta de políticas públicas para a gestão de águas subterrâneas acoplada ao desconhecimento da população e do governo sobre a importância dos aquíferos para o abastecimento público (RIBEIRO *et al.*, 2007).

### **1.1.2.2. Legislação**

Na atualidade, a Organização Mundial de Saúde (OMS) é a instituição que acompanha e recomenda os valores máximos permitidos, a partir dos estudos toxicológicos realizados em todo o mundo e publicados em diferentes revistas e eventos científicos especializados no tema. Alguns países, como os Estados Unidos, o Canadá, e a Comunidade Européia, apesar de se basearem também nas recomendações da OMS, estimulam pesquisas toxicológicas e bioensaios que, reciprocamente, acabam servindo de referência tanto para a OMS como para os demais países. Todas as normas de potabilidade no Brasil seguem basicamente os padrões recomendados pela Organização Mundial de Saúde no *Guidelines for Drinking- Water Quality* (WHO, 1996).

No sentido de proteger a qualidade da água e prevenir riscos para a saúde humana, foram implementadas várias Diretrizes em nível da Comunidade Européia, como a Directiva 80/778/CEE e Directiva 98/83/CE, relativas à qualidade da água destinada ao consumo humano; e Directiva

2000/60/CE, conhecida por Directiva-Quadro da água. Com estas Diretrizes foram fixadas concentrações máximas admissíveis de agrotóxicos na água de consumo humano, de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  para os agrotóxicos individuais e de  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  para a totalidade dos agrotóxicos presentes na água (COUNCIL DIRECTIVE, 1998).

Este limite tem sido motivo de questionamentos, uma vez que não considera a toxicidade de cada agrotóxico individualmente. Além disso, as metodologias analíticas disponíveis para alguns compostos não atingem limites de detecção desta ordem de grandeza (WALLS *et al.*, 1996).

A atual legislação brasileira de potabilidade de água, Portaria MS nº 518/2004, regulamenta 54 substâncias químicas que representam riscos à saúde humana, dentre as quais 22 são agrotóxicos (HELLER *et al.*, 2005). Já a Resolução do CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005, estabelece níveis de qualidade para águas ambientais, avaliados por parâmetros e indicadores específicos, de modo a assegurar o uso das águas doce, salgada e salobra (BRASIL, 2005).

No entanto, o CONAMA (2005) ou a normativa nº 518 do Ministério da Saúde (2004) não restringem a qualidade da água em função de um total de agrotóxico. Elas estabelecem limites individuais para alguns princípios ativos, como para o piretróide permetrina cujo valor máximo permitido (VMP) em águas doces é de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ . No entanto, esta legislação não contempla outros piretróides em uso atualmente, como por exemplo: deltametrina, cipermetrina e bifentrina, estudados neste trabalho.

Gomes *et al.* (2001) apontam que, ao contrário da normativa europeia, a legislação nacional é menos restritiva quanto aos VMP e contempla um número relativamente pequeno de agrotóxicos em relação à diversidade realmente utilizada no país. Da mesma forma, não especifica alguns princípios ativos de relevância, como as classes dos organofosforados e carbamatos, largamente utilizados no país e de grande toxicidade.

Fernandes Neto & Sarcinelli (2009), reforçam a assertiva de que é necessário um processo de revisão da legislação nacional de modo que contemple uma avaliação criteriosa que inclua, dentre outros, o diagnóstico dos princípios ativos mais utilizados e o perfil de uso dessas substâncias, pois podem ter seu uso centralizado em culturas e regiões específicas. Esse

levantamento torna-se especialmente relevante ao se considerarem as características intrínsecas às substâncias (como persistência no ambiente, lixiviação e potencial para bioacumulação, dentre outras) e especificidades inerentes aos compartimentos ambientais (tipo de solo, pH e temperatura do solo e da água, dentre outras).

### **1.1.3. Agrotóxicos selecionados para estudo**

Neste estudo, três diferentes classes de agrotóxicos foram analisadas – Piretróides (cipermetrina, deltametrina); organofosforados (clorpirifós) e os neonicotinóides (Tiametoxan).

#### **1.1.3.1. Piretróides**

Os piretróides são os derivados sintéticos das piretrinas, ésteres tóxicos isolados das flores da espécie *Chrysanthemum cinerariaefolium* e espécies relacionadas (NASUTI *et al.*, 2003). Embora estes compostos tivessem sido modificados para serem mais fotoestáveis, lipofílicos, e mais tóxicos do que a piretrina, são consideravelmente menos tóxicos para os mamíferos do que outras classes de inseticidas, tais como organoclorados, organofosforados e carbamatos (PINE *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2007).

Os piretróides são cerca de 2250 vezes mais tóxicos aos insetos do que aos mamíferos (BRADBERRY *et al.*, 2005). Estes compostos são comprovadamente tóxicos para artrópodes aquáticos, abelhas e peixes (GRISOLIA, 2005), no entanto, não sofrem biomagnificação através da cadeia alimentar (VIRAN *et al.*, 2003). Estudos em animais têm demonstrado que a exposição aos piretróides podem afetar o desenvolvimento neurológico (SHAFER *et al.*, 2005), suprimir o sistema imunológico, e perturbar o sistema endócrino (KIM *et al.*, 2005). Quanto à carcinogenicidade, poucos relatos são encontrados na literatura para que se possa chegar a alguma conclusão sobre a ação dos piretróides (SANTOS *et al.*, 2007)

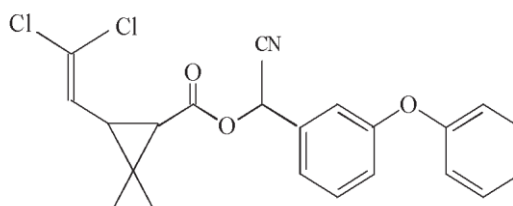
Os efeitos da intoxicação por piretróides estão relacionados à sua estrutura química (Figura 1.2). Os inseticidas sintéticos podem ser estruturalmente divididos em dois grupos segundo a ausência (tipo I) ou presença (tipo II) de um grupo ciano (CN) na porção fenoxibenzil (NASUTI *et*

*al.*, 2003). Assim como nos insetos, os piretróides exercem nos vertebrados um efeito significativo sobre os canais de sódio neural, interferindo na sua abertura e fechamento, prolongando o tempo de entrada dos íons Na<sup>+</sup> para o interior da célula, efeito semelhante ao observado nas intoxicações por DDT (SPENCER *et al.*, 2001; BRADBERRY *et al.*, 2005).

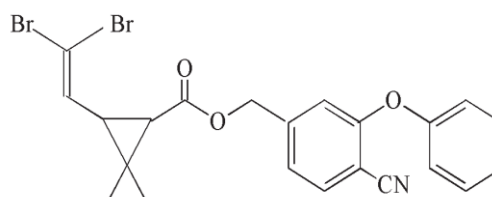
De modo geral, os piretróides possuem meia-vida curta no ambiente (GRISOLIA, 2005), apresentam baixa polaridade e baixa solubilidade em água. A sensibilidade à luz varia entre os vários tipos de piretróides. Em água, o  $\lambda$ -cicalotrina, esfenvalerato, deltametrina, permetrina e cipermetrina não são tão sensíveis e apresentam vida média variando entre 17 e 110 dias. A bifentrina e a fenpropatrina mostraram a menor sensibilidade à luz, com vida média de 400 e 600 dias, respectivamente. Em solução aquosa, os piretróides tendem a ser estáveis em meio ácido e neutro, mas tornam-se crescentemente susceptíveis a hidrólise em valores de pH maiores que 7. Os piretróides bifentrina e fenvalerato por serem estáveis e a permetrina, que apresenta vida média de 240 dias, fazem exceção a essa regra (LASKOWSKI, 2002).

Piretróides sintéticos são inseticidas amplamente utilizados na agricultura, silviculturas, pecuária e em programas de saúde pública. Normalmente, a aplicação destes compostos é realizada na parte foliar das culturas, mas também podem ser utilizados em produtos ensacados e armazenados (ANVISA, 2006). Assim, o uso indiscriminado de piretróides pode afetar drasticamente o equilíbrio do ambiente, requerendo seu monitoramento, através de análises de seus resíduos em diversas fontes.

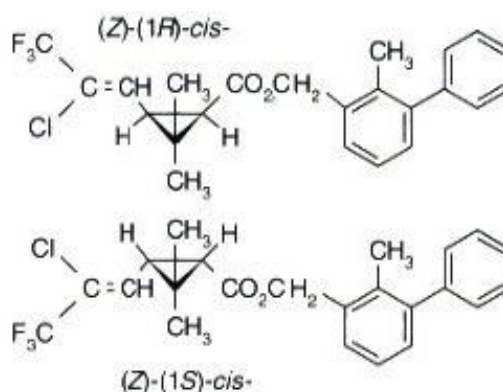
Como os inseticidas piretróides são utilizados em uma grande variedade de culturas, o intervalo de segurança ou o tempo mínimo que deve decorrer entre a última aplicação e a colheita varia de acordo com a cultura e o produto utilizado (SANTOS *et al.*, 2007). Dentre os piretróides mais utilizados destaca-se a deltametrina, cipermetrina e bifentrina, cujas fórmulas estruturais e o nome químico estão representadas na Figura 1.2 (A, B e C).

**(A) Cipermetrina**

$\alpha$ -ciano-3-fenoxibenzil (1R, 3R)-3-(2,2diclorovinil)-2,2dimetil ciclopropano carboxilato

**(B) Deltametrina**

$\alpha$ -ciano-3-fenoxibenzil (1R, 3R) -3- (2,2dibromovinil)-2,2dimetil ciclopropano carboxilato

**(C) Bifentrina**

2-methylbiphenyl-3-ylmethyl (Z)-(1RS,3RS)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enyl)-2,2 dimethylcyclopropano carboxilato

**Figura 1.2 (A, B e C) - Fórmula estrutural e nome químico dos piretróides – (A) cipermetrina, (B) deltametrina e (C) bifentrina**

A deltametrina é considerada o piretróide mais tóxico para vertebrados dentre todos os conhecidos até o momento. O uso da deltametrina é excepcionalmente interessante já que foi obtida do isolamento de apenas um isômero (o mais ativo, D-cis). Normalmente, os piretróides são usados como misturas de dois ou mais isômeros (ABEAS, 2003)

Chauhan *et al.* (2007) concluíram em seu trabalho com linfócitos humanos e células de medula óssea de camundongos que a exposição *in vitro* e *in vivo* a uma formulação comercial de deltametrina pode causar efeitos genotóxicos em mamíferos. A deltametrina também induziu aberrações cromossômicas e micronúcleos em células de medula óssea de ratos (GARRIDO *et al.*, 2005)

A deltametrina apresenta caráter lipofílico. Sua massa molar é 505,24 g mol<sup>-1</sup>, e a pressão de vapor menor que 1,33 x 10<sup>-5</sup> Pa (25 °C). A deltametrina é sólida à temperatura ambiente com ponto de fusão de 100 a 102 °C, e ponto de ebulição de 300 °C (WHO, 1990).

A cipermetrina também é um composto de caráter lipofílico. Sua massa molar é 413,3 g mol<sup>-1</sup>, sendo sólida à temperatura ambiente, estável ao calor e ar, mas instável em meio alcalino, devido á hidrólise do éster. É solúvel em diversos solventes orgânicos como acetona, acetato de etila, benzeno, tolueno e acetonitrila (WHO, 1989).

A cipermetrina é mais estável em meio ácido do que em meio alcalino, com uma estabilidade ótima em pH 4. É hidrolisada sob condições alcalinas pelo ataque nucleofílico do grupo hidroxila na porção éster da molécula. Na degradação são formados o ciclopropano e o fenoxibenzil (CAMILLERI, 1984).

No entanto, apesar das vantagens apresentadas pelos piretróides em relação a outros inseticidas, os mesmos cuidados devem ser tomados para sua utilização, já que podem exercer nos vertebrados efeitos adversos e alterações nos ecossistemas.

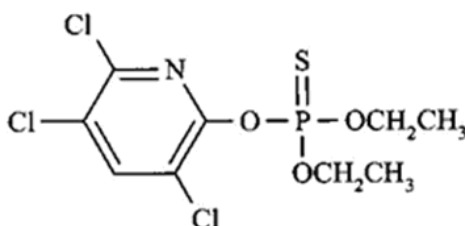
### 1.1.3.2. Organofosforados

Os pesticidas organofosforados constituem uma classe importante de inseticidas usados atualmente no combate a diversos tipos de pragas na agricultura. A aplicação indiscriminada no campo tem originado graves problemas ao meio ambiente. Entre eles, ressalta-se a contaminação dos mananciais usados no abastecimento de água potável das cidades e alimentos. (WHO, 1986)

Os inseticidas organofosforados são menos persistentes no ambiente que os organoclorados, contudo, possuem efeito tóxico mais agudo para seres humanos e outros mamíferos, pois são inibidores da enzima

acetilcolinesterase, essencial para a transmissão de impulsos nervosos (GALLI *et al.*, 2006). A inibição desta enzima pode resultar no acúmulo de acetilcolina nas junções nervosas e outros tecidos, em especial tecidos musculares. O excesso desta substância pode causar efeitos como: dor de cabeça, tonturas, náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia, falta de ar, salivação excessiva, sudorese, lacrimejamento dos olhos e espasmos musculares seguido por paralisia muscular (NRA, 2002).

Os organofosforados possuem em sua estrutura um átomo central de fósforo pentavalente ligado a um átomo de oxigênio ou enxofre, por uma dupla ligação. Tais como os organoclorados, os organofosforados são lipossolúveis, sendo contaminantes potenciais para diversos tipos de alimentos. Dentre esta classe destaca-se o clorpirifós (Figura 1.3), com modo de ação de contato, ingestão e fumigação (ANVISA, 2009).



[0,0-dietil-0-(3,5,6-tricloro-piridil)-fósforo-tionato]

**Figura 1.3** – Fórmula estrutural do agrotóxico clorpirifós

Clorpirifós é um inseticida organofosforado utilizado para o controle de mosquitos, moscas, pragas de diversas culturas no solo e folhagens, pragas domésticas e larvas aquáticas. Também é utilizado em bovinos e ovinos para o controle de ectoparasitas. Por exemplo, o consumo anual no Canadá é na faixa de 100.000 para 500.000 kg (HEALTH CANADÁ, 2009). É também bastante utilizado nos Estados Unidos e no Brasil para o controle de pragas.

Apresenta massa molar igual a 350,6 g mol<sup>-1</sup>, baixa solubilidade em água (1,39 mg L<sup>-1</sup> a 25 °C) e alto coeficiente de sorção no solo (Koc = 849 mL g<sup>-1</sup>). É altamente tóxico (Classe II), sendo que o limite máximo permitido para resíduos de Clorpirifós varia de 0,01 a 1,0 mg kg<sup>-1</sup> de acordo com a cultura (MONTEMURRO *et al.*, 2002). Apresenta-se na forma de um sólido branco

cristalino, cujo ponto de fusão é de 42-43,5 °C e a pressão de vapor é de 1,87 x 10<sup>-5</sup> mm Hg a 25 °C (NRA, 2002).

Clorpirifós é bem absorvido pelo solo e não é esperada uma lixiviação significativa. Ele persiste no solo por 60 a 120 dias, sofrendo degradação, principalmente devido à ação microbiana. A taxa de hidrólise do clorpirifós em água aumenta com o pH e temperatura. Um total de 30 a 60 % de clorpirifós presente na fase aquosa pode desaparecer dentro de 24 horas por meio de adsorção, degradação e vaporização. De acordo com a legislação do Canadá, a concentração máxima aceitável (MAC) de clorpirifós em água potável é 90,0 µg L<sup>-1</sup> (HEALTH CANADÁ, 2009).

Trinta e sete tipos de solo provenientes de diferentes países: Estados Unidos, Canadá e Brasil com acidez e alcalinidade entre 3,8 a 8,5 foram submetidas a teste em laboratório para verificar qual a faixa de pH afetaria a hidrólise do clorpirifós (RACKE *et al.*, 1996). Todos os solos foram irradiados com raios gama de uma fonte de Co-60 para eliminar interferência de degradação biológica. As amostras do solo após serem esterilizadas foram contaminadas com clorpirifós e adicionada uma alíquota de água e armazenada em local escuro. O principal fator que afetou a hidrólise do clorpirifós no solo foi o pH. Em solos cujo pH variava de ácido a neutro, pH ≤ 7, a hidrólise era lenta. Em solos alcalinos, pH > 7, a hidrólise era rápida, sendo esta a principal forma de degradação do inseticida.

### 1.1.3.3. Neonicotinóides

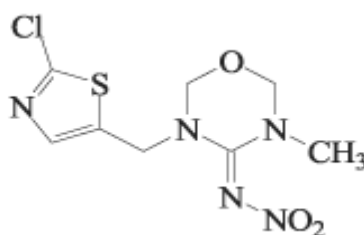
Os neonicotinóides, a mais nova classe de inseticidas, têm potência excepcional e ação sistêmica para a proteção das culturas contra insetos-praga, e são altamente eficazes para o controle de pulgas em gatos e cães. Eles geralmente têm baixa toxicidade para mamíferos (aguda e crônica), aves e peixes (TOMIZAWA & CASIDA, 2005). Assim como a nicotina, os neonicotinóides atuam no sistema nervoso central dos insetos como agonistas da acetilcolina nos receptores nicotínicos pós-sinápticos (NAUEN *et al.*, 2001).

Dong *et al.* (2009) realizaram uma análise retrospectiva de todas as exposições a neonicotinóides informadas ao Centro de envenenamento do Instituto Nacional de Taiwan, com o objetivo de melhor entender o perfil de

toxicidade destes inseticidas. Um total de 70 pacientes foram analisados. A maioria dos riscos envolvidos era por ingestões de imidacloprid, na tentativa de suicídio. Estes autores concluíram que as manifestações clínicas de toxicidade de inseticidas neonicotinóides têm alguma semelhança com os da intoxicação aguda de nicotina. Embora a maioria das exposições apresentasse leve a moderada severidade, oito pacientes desenvolveram efeitos principais e dois morreram. Pneumonia e insuficiência respiratória foram a principal causa da toxicidade dos neonicotinóides.

Alguns compostos desta classe de inseticida têm capacidade de persistir por vários anos, sendo resíduos destes detectados em plantas anos após a sua aplicação. Estudos realizados na Europa na década de 1990 relatam que os resíduos de neonicotinóides podem se acumular no pólen e néctar de plantas tratadas com estas substâncias e representam um risco potencial para a polinização (EPA, 2009).

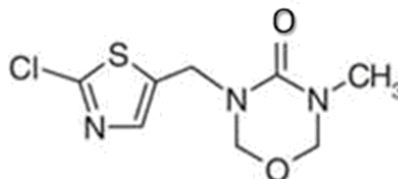
Entre os inseticidas mais recentes e estudados, disponíveis no mercado, o tiametoxam tem sido testado com sucesso em muitas espécies vegetais de importância econômica no controle de insetos sugadores de diversas culturas. O inseticida tiametoxam, composto da classe dos neonicotinóides, foi introduzido no Brasil em 1999. Por apresentar propriedades sistêmicas (MAIENFISCH *et al.*, 2001), o tiametoxam não é utilizado apenas na forma de pulverização. Sua aplicação no solo visa o controle de insetos-praga da parte aérea das plantas, como é o caso do bicho-mineiro em folhas de cafeeiro (URZEDO *et al.*, 2006). A Figura 1.4 apresenta a estrutura química do inseticida tiametoxam.



3-(2-cloro-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-[1,3,5]oxadiazinan-4-ilideno-N-nitroamina

**Figura 1.4** – Fórmula estrutural do agrotóxico tiametoxam

O tiametoxam possui massa molar igual a  $291,7 \text{ g mol}^{-1}$ , é de classe toxicológica IV (tarja verde) (ANVISA, 2009). Segundo SCHWARTZ *et al.* (2002), o thiamethoxam sofre degradação sob condições fotolíticas, podendo haver desta maneira, a formação do seu metabólito 3-(2-chloro-thiazolyl-5-ylmethyl)-5-methyl-4-oxo-oxodiazine, cuja estrutura encontra-se na Figura 1.5.



3-(2-chloro-thiazolyl-5-ylmethyl)-5-methyl-4-oxo-oxodiazine

**Figura 1.5** - Fórmula estrutural do composto obtido da degradação do tiametoxam

Estudos sobre a dissipação do tiametoxam em solos são escassos e restritos a solos norte americanos e europeus. ANTUNES-KENYON e KENNEDY (2001) relataram que sob condições de fotodegradação, a estabilidade do tiametoxam em solos é moderada com valores de meia-vida em torno de 50 dias. Já em condições aeróbicas e na ausência de luz, os valores de meia-vida alcançaram 385 dias.

De acordo com ANTUNES-KENYON & KENNEDY (2001), as propriedades e características do tiametoxam o enquadram como contaminante potencial da água do subsolo. Tal assertiva foi baseada na baixa adsorção do composto nos colóides do solo e na sua alta estabilidade nos solos estudados. Segundo esses autores, esse inseticida apresenta propriedades e características similares a pesticidas detectados na água do lençol freático em várias partes dos Estados Unidos, ou seja, polaridade relativamente alta ( $\log K_{ow} = -0,2$ ), baixo coeficiente de sorção ( $K_{oc} = 32$  a  $70$ ) e estabilidade moderada a alta em solos ( $t_{1/2} = 47$  a  $385$  dias).

Em um estudo CASTRO *et al.* (2008) investigaram a lixiviação do inseticida tiametoxam em dois solos da região de Lavras-MG, pertencentes às classes Latossolo Vermelho Acriférico típico ( $LV_{wf}$ ) e Argissolo Vermelho-Amarelo Distrófico típico ( $PVA_d$ ). Os resultados mostraram que o inseticida tiametoxam revelou-se altamente lixiviável em macrolisímetros de material indeformado dos solos, mantidos sem vegetação e sob chuva natural.

#### **1.1.4. Técnicas de extração de resíduos agrotóxicos em alimentos e amostras ambientais**

Dentre os procedimentos analíticos empregados na determinação de multirresíduos de agrotóxicos, a extração dos analitos é considerada uma das etapas laboratoriais mais importantes, realizada antes da determinação de um composto em uma amostra ambiental (JARDIM *et al.*, 2009). A busca por limites de quantificação cada vez mais baixos conduziu a um crescente desenvolvimento de técnicas de extração e pré-concentração de pesticidas, cada vez mais eficientes, visando alcançar os limites impostos pela legislação (KUSTER *et al.*, 2006).

Os resíduos de agrotóxicos são encontrados extensivamente em nosso ambiente, incluindo água, solo e alimentos (LIU *et al.*, 2005). Porém, o desenvolvimento de métodos multirresíduos é difícil e trabalhoso, devido ao fato de envolver compostos com diferentes polaridades, solubilidades, volatilidades e distintos valores de pKa, numa extração e análise conjunta (STAJNBAHER & ZUPANCIC-KARALJ, 2003). A determinação de resíduos de agrotóxicos é um desafio, considerando as baixíssimas concentrações dos analitos, sua diversidade e diferentes propriedades físicas e químicas, em presença de altas concentrações de compostos interferentes (KUSTER *et al.*, 2006).

A escolha do método de extração e/ou concentração a ser utilizado deve levar em conta as seguintes características: Inclusão de um número máximo de pesticidas possíveis em um procedimento único (ensaio multiresidual), recuperações o mais próximo possível de 100%, remoção de interferentes da amostra para aumentar a seletividade e evitar os efeitos indesejáveis da matriz, aumento da concentração dos analitos e conseqüentemente a sensibilidade do ensaio, apresentar boa precisão e robustez, baixo custo, ser rápido, fácil e seguro (quantidade baixa de solventes, solventes menos nocivos) (HERCEGOVÁ *et al.*, 2007).

Os solventes mais utilizados para extração multirresíduo de pesticidas são: acetato de etila, acetona e acetonitrila, sendo que cada um destes apresenta vantagens e desvantagens (MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004).

Acetato de etila (EtAc) tem demonstrado ser um solvente com características universais, uma vez que possui capacidade para extrair agrotóxicos de diferentes classes em diversos tipos de amostras, porém os percentuais de recuperação de pesticidas com caráter básico ( $pK_a > 4$ ) são baixos devido a problemas de degradação, sendo necessária a adição de hidróxido de sódio para um aumento destes percentuais (PIHLSTRÖM *et al.*, 2007). O acetato de etila é praticamente imiscível com água (apenas 7,94%, v/v, da água é solúvel em EtAc a 20 °C), que pode facilmente ser removida dos extratos EtAc por uma agente secagem (geralmente  $Na_2SO_4$  anidro) (VAN DER HOFF & VAN ZONEN, 1999)

A acetona e acetonitrila (MeCN) são miscíveis com água e promovem a extração em uma fase única quando em contato com a matriz. Quando uma extração é realizada com acetona há necessidade de adição de solventes não polares para que ocorra a separação entre as fases orgânica e aquosa (MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004), o que leva à diluição e possibilidade de recuperação menor de analitos mais polares. O mesmo não é necessário quando se utiliza acetonitrila, uma vez que a adição de sais ao extrato faz com que ocorra tal separação (MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY, 2006). A acetona é incompatível com o sistema de cromatografia gasosa, sendo então necessária, após a extração dos agrotóxicos, a evaporação da acetona e redissolução dos resíduos em outro solvente (PUSSENTE, 2008).

A utilização de acetonitrila, entretanto, possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos, e proporciona a extração de uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades em comparação com acetona e acetato de etila (quantidade de co-extrativos lipofílicos diminui na ordem: EtAc > acetona > MeCN) (LEHOTAY *et al.*, 2001).

Entretanto, estes mesmos autores ressaltam que, o acetato de etila é mais eficaz em evitar a co-extração de açúcares, principalmente comparado à acetona. Entre os três solventes, acetona é o menos adequado para isolamento dos resíduos de agrotóxicos em amostras, e MeCN oferece vantagens na seletividade de extração e a compatibilidade com as mais diversas técnicas analíticas em comparação com EtAc (LEHOTAY, 2001).

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) a acetonitrila não é classificada como um cancerígeno humano e não é persistente no meio ambiente. Além disso, a menor volatilidade da MeCN reduz a exposição do analista, que pode ser ainda minimizado seguindo os procedimentos adequados de manipulação.

Segundo ANASTASSIADES *et al.* (2003), o primeiro método multirresíduo para extração de pesticidas foi desenvolvido por Mills *et al.* na década de 1960, nos laboratórios do *U.S. Food and Drug Administration* (FDA). O método baseia-se em uma extração com acetonitrila (MeCN) sendo utilizado basicamente na determinação de compostos organoclorados não polares em amostras não-gordurosas.

Em 1975, Luke *et al.* desenvolveram o denominado método de Luke para o monitoramento de alimentos, estudos de avaliação de riscos e análises de rotina em amostras não gordurosas, tais como frutas e vegetais. Este método consiste em uma etapa de extração inicial dos pesticidas com acetona seguida de uma partição líquido-líquido com solventes apolares, éter de petróleo e diclorometano, logo após adiciona-se cloreto de sódio para remover a água co-extraída (SCHECNK *et al.*, 2002) e obter-se maiores percentuais de recuperação, forçando assim com que os pesticidas polares presentes na fase aquosa, sejam conduzidos para a fase orgânica (DIÉZ *et al.*, 2006).

Em 1976, Krijgsman *et al.*, com o intuito de melhorar os resultados obtidos com o método de Luke, propuseram a extração de agrotóxicos utilizando acetato de etila com subsequente adição de sulfato de sódio anidro, obtendo maior rapidez, simplicidade, limpeza dos extratos e melhores valores de recuperação para os compostos polares, quando comparado ao método de Luke. Todas as vantagens deste método fizeram dele o método de extração oficial adotado por algumas agências reguladoras europeias (DIÉZ *et al.*, 2006).

Na década de 80, o ministério da agricultura na Holanda (VWA, *Food and Consumer Product Safety Authority*) desenvolveu em seu laboratório o método de extração mini-Luke, o qual é uma miniaturização do método de extração Luke original, omitindo-se a etapa de particionamento com cloreto de sódio. A miniaturização deste método possibilitou a redução da quantidade de amostra, bem como de solventes utilizados. Entretanto, valores baixos de recuperação (<70%) foram obtidos para agrotóxicos polares, como

metamidofós, ometoato, monocrotofós entre outros. Como um método de extração alternativo, foi proposto, nos anos 90 no VWA, modificações do método de extração mini-Luke, onde sulfato de sódio anidro foi adicionado na etapa de extração levando, assim, a uma melhor extração dos agrotóxicos polares (HIEMSTRA & KOK, 2007).

Ambos os métodos estabelecidos têm sido modificados em muitos aspectos, a fim de assegurar melhores porcentagens de recuperação dos analitos, saúde dos analistas e segurança ambiental.

Outros métodos de extração usando acetonitrila foram desenvolvidos. Sua ampla aplicação começa nos últimos anos após a introdução do método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), a qual reflete as suas maiores vantagens (rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro). Este método envolve uma extração inicial com acetonitrila, seguida por uma etapa de partição líquido-líquido após adição de uma mistura de sais anidros ( $MgSO_4$  e  $NaCl$ ), os quais facilitam a remoção de uma quantidade significativa de componentes polares da matriz (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Finalmente, uma etapa simples de purificação denominada extração em fase sólida dispersiva (SPE) é efetuada, onde um sorvente amina primária secundária (PSA, do inglês *Primary Secondary Amine*) é adicionado diretamente ao extrato da matriz (MASTOVSKA & LEHOTAY, 2004).

No laboratório de Química analítica (LAQUA) da Universidade Federal de Viçosa – Viçosa/MG, várias metodologias utilizando acetonitrila como solvente extrator para análise de resíduos de agrotóxicos, tem sido validadas. Em 2004, Goulart desenvolveu uma metodologia, para extração e análise de piretróides em leite sem a necessidade de etapas de *clean-up*, usando cromatografia gasosa. Posteriormente, (VIEIRA *et al.*, 2007) aplicou esta técnica para extração simultânea de cipermetrina, deltametrina,  $\lambda$ -cialotrina e permetrina em amostras de água e solo, denominado-a de Extração Líquido-Líquido e Partição em Baixa Temperatura (ELL-PBT) e Extração Sólido Líquido e Partição em Baixa Temperatura (ESL-PBT).

Dardengo (2007) adaptou a técnica de ESL-PBT para análise simultânea dos inseticidas clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em amostras de batata e Bittencourt (2008) determinou a dissipação dos inseticidas clorpirifós e thiamethoxam em tubérculos e em solo cultivado com batata. Pinho

(2007) validou a técnica para determinação de resíduos encontrados em tomates e Pussente (2008) otimizou esse método para análise de agrotóxicos em maçã. A técnica foi empregada também para determinação de agrotóxicos em carne bovina (SILVA, 2008) e em amostras de mel (PINHO, 2009).

Esses pesquisadores mostraram que a metodologia é simples e de baixo custo podendo ser aplicada para várias matrizes diferentes, com bons rendimentos de extração para todos agrotóxicos investigados. A técnica 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 apresente líquido a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, a amostra é agitada e levada ao freezer por um período mínimo de seis horas. Nesta etapa, a fase aquosa, junto com a amostra caso seja um sólido congela ficando na parte inferior do recipiente utilizado, e a fase superior contendo o solvente e os pesticidas extraídos são filtrados em papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro para eliminar possível presença de água, seguida da análise do extrato por cromatografia gasosa.

Além das técnicas citadas acima, outros métodos de extração de resíduos de agrotóxicos aplicados às diversas matrizes ambientais e em alimentos são encontrados na literatura: Extração Líquido-Líquido - ELL (KRISTENSSON, 2005; PICÓ *et al.*, 2007), Microextração Líquido-Líquido - MELL (CARASEK, 1997; MENEGHINI, 2006), Microextração em Fase Sólida - MEFS (GONÇALVES & ALPENDURADA, 2002; FYTIANOS *et al.*, 2006), Extração em Fase Sólida - EFS (ŠTAJNBAHER & ZUPANCIC-KARAL, 2003; NETO *et al.*, 2005), Extração em Ponto Nuvem - CPE (FARIA *et al.*, 2005), Extração com Fluido Supercrítico - SFE (LEHOTAY, 1997); Extração Assistida por Microondas (PAPADAKIS *et al.*, 2006)

Apesar do surgimento de técnicas modernas de separação, onde se pode obter alta seletividade e sensibilidade, em termos de detecção, para um dado analito (ou classe), presente em matrizes complexas, o preparo de amostra ainda é necessário, sendo esta etapa mais problemática da análise.

#### **1.1.4.1. Partição induzida por sal (*salting out*)**

Na extração líquido-líquido convencional ocorre a partição da amostra entre duas fases de miscibilidade limitada. A eficiência da extração depende da

afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações. Para alguns sistemas, o valor da constante de distribuição,  $K_D$  do analito entre as fases pode ser aumentado pelo ajuste do pH, de forma a prevenir a ionização de ácidos ou bases, pela formação de par iônico com solutos ionizáveis, pela formação de complexos lipofílicos com íons metálicos ou pela adição de sais neutros, para diminuir a solubilidade de compostos orgânicos na fase aquosa (SNYDER *et al.*, 1997).

A adição de sais para promover o efeito *salting out* tem sido utilizada em vários métodos multirresíduo. Dependendo da natureza do solvente utilizado na etapa de partição obtém-se melhores percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (ANASTASSIADES, 2003)

Este comportamento pode ser explicado em termos de solvatação dos analitos. A atividade da água é alterada, devido ao efeito *salting out*, pelo qual as moléculas de água formam esferas de hidratação ao redor dos íons do sal. A adição de sal exerce forte efeito sobre a eficiência de extração, que depende da natureza do analito e da concentração do sal. Em geral o efeito *salting out*, se amplia com o aumento da polaridade do composto (PAWLISZIN, 1997). Este efeito é mais pronunciado para analitos com coeficiente de partição pequeno (SHELLIN, 2004).

Cloreto de sódio e sulfato de magnésio são os sais mais utilizados, entretanto outros sais inorgânicos e orgânicos têm sido utilizados. Os diferentes tipos e concentrações de sais resultam em diferentes eficiências de separação de fases (MAJORS, 2009).

Em um estudo realizado por Carasek (1997) usando a técnica de microextração líquido-líquido e utilizando o frasco de Murray modificado para extração dos agrotóxicos organoclorados e análise por cromatografia gasosa, concluiu-se que o efeito *salting out* favorece a passagem dos agrotóxicos para a fase orgânica e que não há necessidade de saturar a fase aquosa com sal.

No desenvolvimento do método QuEChERS e método de Luke utiliza-se adição de sais para romper o equilíbrio das fases (*salting out*), afim de extrair resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais. Segundo Anastassiastes *et al.* (2003), é importante adicionar o sal após a adição do solvente extrator e não

diretamente sobre a amostra de matérias-primas. Dependendo do tipo de sal, a sua dissolução proporciona uma reação exotérmica e pode causar aquecimento localizado na amostra, potencialmente causadoras de decomposição térmica.

O efeito *salting out* também tem sido utilizado de forma eficaz com extração em fase vapor usando técnicas de headspace. A adição de um sal inorgânico, muitas vezes tem sido usada para melhorar os coeficientes de atividade dos componentes voláteis em solução aquosa, aumentando a concentração do vapor de headspace. Quanto maior o número de átomos de carbono em um composto, maior será o efeito *salting out*, pois este efeito resulta na baixa solubilidade dos compostos de alta massa molecular na água (MAJORS, 2009).

A técnica de extração por adição de sais (*salting out*) também pode ser usada para a extração de drogas em fluidos biológicos (sangue, urina, plasma). Recentemente, Zhang *et al.* (2009) relataram uma técnica nova de *salting out* assistida por extração líquido líquido (ELL) com acetonitrila para o medicamento Kaletra® em amostras de plasma humano e animal. Dois compostos (lopinavir e ritonavir) são formuladas de Kaletra, que é utilizado como um inibidor da protease HIV.

Aplicações da precipitação de proteínas por *salting out* usando o sal sulfato de amônio podem ser verificadas nos trabalhos de Nasiri *et al.* (2005) para extração de DNA genômico do sangue. A técnica pode ser também utilizada para extração de íons de metais pesados em solução aquosa. NAGOSA *et al* (1997) foram capazes de determinar o cobre (II) e níquel (II) em amostras biológicas (chá e folhas de citros) (MAJORS, 2009).

Embora o fenômeno *salting out* seja conhecido há muitos anos, alguns estudos sistemáticos têm sido realizados para ajudar a escolher o melhor sistema de solventes e aditivos de sal. A técnica em si não é nova, mas recentemente tem aumentado as suas aplicações, devido a seu baixo custo, praticidade e fornecimento de resultados eficientes.

### 1.1.5. Métodos de análise de agrotóxicos

A análise de resíduos de agrotóxicos, nos mais diferentes meios, é tradicionalmente realizada utilizando-se técnicas cromatográficas. 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, empregando detectores mais seletivos (GALLI *et al.*, 2006).

Segundo Collins *et al.* (2006), a cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura combinada com análises qualitativas e quantitativas. A separação das substâncias é realizada pela distribuição diferencial destes componentes entre a fase estacionária e a fase móvel. A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido disposto sobre um suporte sólido com grande área superficial. A fase móvel, que pode ser gasosa, líquida ou ainda um fluido supercrítico, passa sobre a fase estacionária, arrastando consigo os diversos componentes da mistura.

Desde os anos 1970 têm-se utilizado a técnica de cromatografia gasosa (CG) acoplada a sistemas clássicos de detecção como, por exemplo, detecção por captura de elétrons (DCE, *Electron Capture Detection*), detecção de nitrogênio e fósforo (DNP, *Nitrogen and Phosphorus Detection*), detecção por fotometria de chama (DFC, *Flame Photometric Detection*) e detecção por ionização em chama, (FID, *Flame Ionization Detection*) para a determinação de resíduos de agrotóxicos (ROMERO-GONZALEZ *et al.*, 2006; HERNÁNDEZ-BORGES *et al.*, 2007). Sendo o detector por captura de elétrons (DCE) muito utilizado para análise de compostos halogenados.

O detector por captura de elétrons é seletivo, respondendo muito bem a halogenetos orgânicos, aldeídos conjugados, nitrilas, nitratos e organometálicos. É praticamente insensível a hidrocarbonetos, álcoois e cetonas. A sensibilidade seletiva a haletos faz com que este detector seja útil na análise de agrotóxicos clorados (COLLINS *et al.*, 1990).

As aplicações das técnicas cromatográficas cresceram intensamente nos últimos 50 anos; isto se deve não somente ao desenvolvimento de novos tipos de técnicas de preparação, separação e detecção, mas também pela necessidade crescente de técnicas mais precisas e sensíveis para caracterização e quantificação de analitos de interesse em matrizes complexas,

tais como águas naturais, solos, alimentos, sangue, urina e outros tipos de fluidos biológicos (SKOOG *et al.*, 1998).

O espectrômetro de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) acoplado ao CG possui a habilidade de quantificar e confirmar a identidade dos agrotóxicos presentes em amostras complexas em pequenas quantidades (GALLI *et al.*, 2006). O detector seletivo de massas é extremamente importante na análise de resíduos de agrotóxicos devido ao seu baixo limite de detecção podendo ser utilizado para a identificação precisa de um composto desconhecido com base na sua massa molecular, fórmula empírica e fragmentação do analito (SANTOS *et al.*, 2007).

Porém, com o surgimento nos últimos anos de novos compostos que não podem ser determinados por CG, por sua baixa volatilidade, alta polaridade e instabilidade térmica, o uso da cromatografia líquida (CL) vem sendo intensificado para complementar as análises multirresiduais. O acoplamento dessa técnica ao espectrômetro de massa (MS), têm se mostrado uma ferramenta muito útil na análise de matrizes complexas. Agrotóxicos pertencentes às classes das carboxamidas, quinazonas, fenoxipirazóis, estrobilurinas, pirimidina, triazóis, carbamatos, neonicotinóides e morfolinás são representantes destas novas moléculas recentemente introduzidas para uso na agricultura (SANNINO *et al.*, 2004).

A combinação do espectrômetro de massa com outras técnicas de separação, como a eletroforese capilar, a cromatografia em camada delgada e a cromatografia de permeação em gel é possível, mas usada com menor frequência. Vários instrumentos robustos e confiáveis estão disponíveis. Assim técnicas cromatográficas acopladas ao espectrômetro de massa em série como ocorre com GC-MS/MS, a LC-MS/MS permite um aumento de seletividade e sensibilidade, proporcionando o monitoramento de centenas de agrotóxicos em uma única análise (CHIARADIA *et al.*, 2008).

#### **1.1.6. Validação do método analítico**

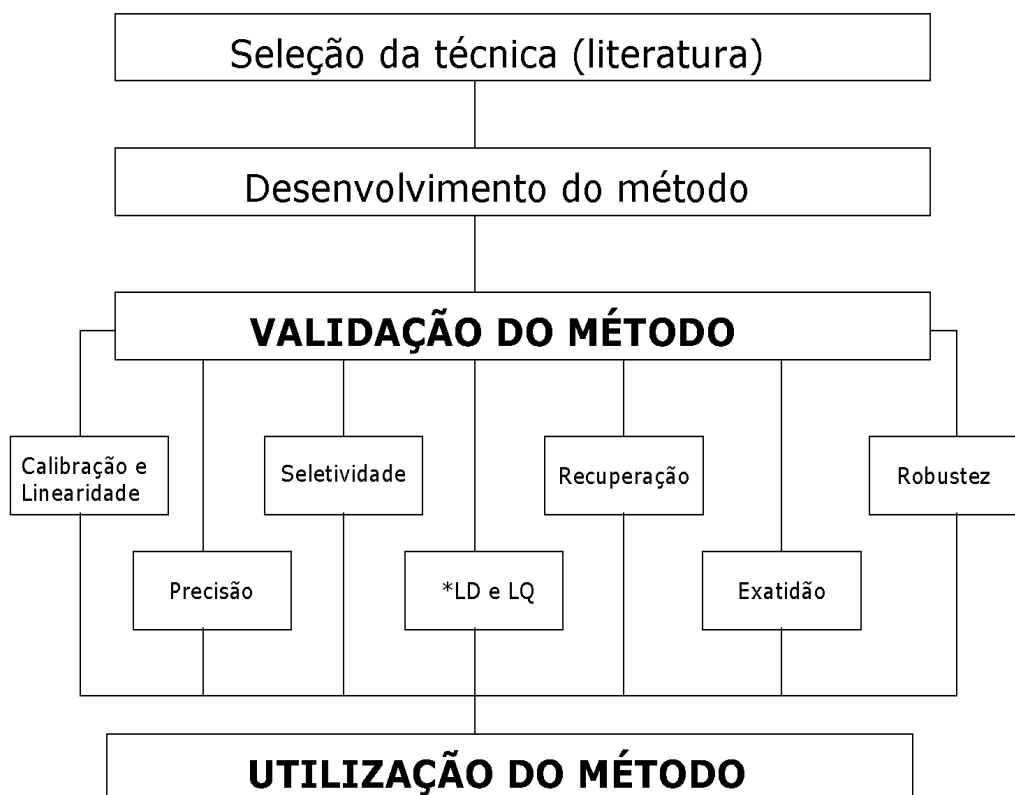
A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003). Deve levar em consideração

todas as incertezas do processo analítico, incluindo àquelas atribuídas aos equipamentos, padrões, calibrações, analista e ambiente (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2007).

No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008 revisado em junho/2007. Há ainda órgãos internacionais, como União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), Organização Internacional para Padronização (ISO, do inglês *International Organization for Standardization*), Conferência Internacional em Harmonização (ICH, do inglês *International Conference on Harmonization*), que também estabelecem procedimentos de validação como critério fundamental no credenciamento de laboratórios (RIBANI *et al.*, 2004).

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e objetivos criteriosos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência, de acordo com a Figura 1.6.

Na literatura, existem diversas formas de se conduzir a validação de um método analítico, no entanto, os principais parâmetros são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (INMETRO, 2007). Estes termos são conhecidos como critérios de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito (RIBANI *et al.*, 2004).



**FIGURA 1.6** - Fluxograma das etapas do processo de validação

\*LD: Limite de detecção e LQ: Limite de quantificação

Fonte: (FERNANDES, 2004)

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.2.1. Objetivo Geral

- Desenvolver uma metodologia analítica otimizada para extração de agrotóxicos em amostras de água por cromatografia gasosa, baseada na extração líquido-líquido com partição induzida por sal (efeito *salting out*).

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Otimizar as condições de análise simultânea dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG-DCE);
- Otimizar e validar a técnica de extração líquido-líquido com partição induzida por sal para análise dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina em amostras de água por CG-DCE;
- Aplicar o método otimizado e validado em amostra de águas superficiais e de águas de lavagem de frutas e hortaliças comercializadas na região de Viçosa-MG/Brasil;
- Adaptar a metodologia proposta e validada para extração e quantificação de multiresíduos em água para análise das polpas das frutas e hortaliças (maçã, morango, pimentão e tomate) adquiridas no comércio local de Viçosa-MG.

## 1.3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.3.1. Reagentes e equipamentos

Neste trabalho foram utilizados soluções padrões de clorpirifós (99,0% m/m), cipermetrina (92,4% m/m) e deltametrina (99,0% m/m) obtidos da Chem Service (West Chester, PA, USA), tiametoxam (99,7% m/m) obtida da Sigma-Aldrich (Germany) e bifentrina (92,2 % m/m – FMC do Brasil) , utilizada como padrão interno.

Os solventes acetonitrila (Mallinckrodt, grau HPLC) e acetato de etila (Mallinckrodt) foram empregados como extratores. Solução de cloreto de sódio (Reagen – P.A.) foi utilizada para romper o equilíbrio da solução (efeito *salting out*). Os instrumentos utilizados neste trabalho foram: Cromatógrafo a gás da Shimadzu (GC-2014) com detector por captura de elétrons (DCE), equipado com auto-injetor AOC-20i) e uma coluna capilar HP-5 da Agilent Technologies, banho ultrassônico (Unique, MAXICLEAN 750), mesa agitadora (Tecnal TE – 420) a 25 °C e 175 oscilações por minuto, vórtex (Unique, MAXICLEAN 750) e balança analítica (Satorius BP 2215 com precisão de  $1 \times 10^{-4}$  g).

Foram utilizados também frascos de vidro transparente com tampa e septo de Teflon de 22 mL de capacidade e pipetas automáticas para o preparo dos padrões e recolhimento da fase orgânica superior do sistema bifásico, entre outras vidrarias.

### 1.3.2. Preparo de soluções padrão

Soluções estoque de 500,0 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas pela solubilização de quantidades adequadas dos princípios ativos em acetonitrila (Mallinckrodt/HPLC) e armazenadas no freezer a – 20 °C.

A partir de diluições da solução estoque, foi preparada uma solução de trabalho contendo os agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina em concentrações de 5,0 mg L<sup>-1</sup>. Uma solução de bifentrina (5,0 mg L<sup>-1</sup>), também em acetonitrila, foi preparada com a finalidade de ser usada como padrão interno nas análises cromatográficas dos agrotóxicos. As demais soluções foram obtidas a partir de diluições da solução estoque.

### **1.3.3. Preparo de soluções padronizadas de deltametrina e cipermetrina a partir de produtos comerciais**

A técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (VIEIRA, 2007) validada para análise de piretróides em água, foi adaptada para extração dos princípios ativos deltametrina e cipermetrina dos produtos comerciais K-Othrine (Bayer Environmental Science) e Cyperpour (Vetbrands), respectivamente.

Dos produtos comerciais foi retirado 1,0 mL de solução e diluída com água destilada em balão volumétrico de 10,0 seguido de homogeneização. Uma alíquota de 4,0 mL desta solução foi misturada com 8,0 mL do solvente extrator acetonitrila em um frasco de vidro transparente. Essa solução foi mantida sob agitação mecânica em mesa agitadora por 30 min a 180 rpm e em seguida deixada em freezer a aproximadamente - 20 °C por 12 h. Após este período, a fase orgânica líquida contendo o analito de interesse foi passada por um papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro, sendo o papel de filtro previamente lavado com acetonitrila. O extrato foi recuperado em balão volumétrico de 10,0 mL e o volume aferido com acetonitrila. Os extratos foram submetidos a análise por CG-DCE.

A quantificação destes agrotóxicos nos extratos foi feita comparando a resposta do equipamento para esses agrotóxicos com a de padrões de deltametrina e cipermetrina em concentrações conhecidas. Essas soluções padrões provenientes de produtos comerciais, foram utilizadas somente na etapa de otimização do método de extração líquido-líquido e partição induzida por sal (ELL-PIS).

### **1.3.4. Preparo de amostras de água fortificadas**

Amostras de 3,0 mL de água destilada foram fortificadas com 100  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho contendo os quatro agrotóxicos na concentração de 5,0 mg  $\text{L}^{-1}$ .

### **1.3.5. Limpeza do material utilizado**

A vidraria empregada na execução deste trabalho foi inicialmente lavada com água corrente e detergente, em seguida, deixada em contato com solução contendo ácido nítrico e clorídrico (6% v/v), por aproximadamente 12 h. Após este período os materiais foram lavados com água destilada e secos em estufa, (exceto as vidrarias volumétricas). Os materiais limpos foram então armazenados em armário.

### **1.3.6. Otimização da técnica Extração Líquido-Líquido com Partição Induzida por Sal (ELL-PIS)**

A técnica de extração líquido-líquido com partição induzida por sal (ELL-PIS) foi otimizada para extração dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina em água. Alguns testes foram realizados utilizando amostras de água destilada fortificadas pela adição de quantidades conhecidas destes compostos, que foram submetidas ao processo de extração. A quantificação dos analitos foi feita por cromatografia gasosa empregando detecção por captura de elétrons (CG-DCE) utilizando o método do padrão interno. Os experimentos realizados na otimização são descritos nos itens a seguir.

#### **1.3.6.1. Avaliação da eficiência da mistura extratora água/acetoneitrila/acetato de etila na recuperação dos agrotóxicos**

Neste estudo foram realizados testes preliminares para estabelecer a proporção ideal entre o volume de água e os solventes acetoneitrila e acetato de etila que proporcionasse melhor porcentagem de extração dos princípios ativos de interesse na matriz água. A proporção amostra:mistura extratora deve ser tal

que forme uma fase única, para que somente após a adição da solução salina ocorra separação das fases. As proporções de água e solventes utilizados se encontram na Tabela 1.2.

**Tabela 1.2** - Volumes da matriz água e dos solventes acetonitrila e acetato de etila utilizados na mistura extratora para recuperação dos analitos.

Proporção*:	água (mL)	acetonitrila (mL)	acetato de etila (mL)
A	4,50	5,00	1,5
B	3,00	5,00	1,0
C	4,50	5,50	1,5
D	4,50	6,00	1,5
E	4,00	4,00	1,0
F	3,00	6,00	1,0

\* Proporção amostra/solvente extrator

Amostras de água destilada foram previamente fortificadas com 100,0  $\mu\text{L}$  da solução preparada com os princípios ativos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina de concentração igual a 5,0  $\text{mg L}^{-1}$  e deixadas em repouso por 30 minutos para que pudesse ocorrer maior interação dos compostos e evaporação do solvente. Os volumes de amostra e solvente foram avaliados de modo que a sua adição não formasse um sistema bifásico.

Adicionou-se o solvente extrator (acetonitrila/acetato de etila) à amostra e agitou-se a mistura manualmente formando uma fase única. Para romper este equilíbrio foi acrescentado 1,0 mL de solução de NaCl 2,0  $\text{mol L}^{-1}$ , em seguida a mistura foi agitada em vórtex por 40 segundos formando um sistema bifásico. As misturas foram deixadas em repouso e a fase orgânica superior foi retirada com pipeta automática e os volumes dos extratos foram evaporados com nitrogênio (volume > 5,0 mL) ou ajustados, com acetonitrila (volume < 5,0) em balões volumétricos de 5,0 mL contendo 100  $\mu\text{L}$  de solução padrão de bifentrina a 5,0  $\text{mg L}^{-1}$  (padrão interno) e analisado por CG-DCE. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

### 1.3.6.2. Efeito da concentração salina

Nesta etapa foi estudada a influência da concentração salina na taxa de recuperação dos compostos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina em amostras de água. O equilíbrio estabelecido entre a fase aquosa (amostra) e a fase orgânica foi rompido com a adição de 1,0 mL de solução aquosa de NaCl em diferentes concentrações. Foram avaliadas adição de 1,0 mL de solução 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mol L<sup>-1</sup> de NaCl. Foi avaliado também se ocorreria a formação do sistema bifásico quando se adicionava 1,0 e 2,0 mol L<sup>-1</sup> de solução de sacarose, efeito conhecido como *sugaring out*.

### 1.3.6.3. Influência da forma e tempo de agitação das amostras na porcentagem de recuperação dos analitos

Realizou-se testes em amostras previamente fortificadas de acordo com o item 1.3.4, que foram extraídas com 6,0 mL de mistura extratora (5,0 mL de acetonitrila e 1,0 mL de acetato de etila) e adição de 1,0 mL de solução salina 2,0 mol L<sup>-1</sup>, afim de romper o equilíbrio da fase única.

Para avaliar o efeito do tipo de agitação sobre a eficiência da extração foram testados o modo de agitação em vórtex nos tempos de 20 s, 40 s e 1 minuto, mesa agitadora a 25 ° C e 175 oscilações por min nos tempos 10, 20 e 30 minutos, ultrassom por 5, 10 e 15 minutos.

Posteriormente, as amostras foram submetidas aos procedimentos de extração, para determinação das condições ótimas para análise dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina, por cromatografia gasosa.

### 1.3.6.4. Planejamento fatorial 2<sup>3</sup>

O estudo univariado realizado previamente foi importante para auxiliar na escolha das variáveis e na especificação dos níveis em que cada fator seria estudado. Após os testes preliminares, onde se estudou separadamente as condições ideais que proporcionassem melhor porcentagem de extração dos princípios ativos de interesse na matriz água, realizou-se um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> para verificar o comportamento simultâneo dos fatores: (F1)

proporção entre o volume de água, acetonitrila e acetato de etila, (F2) concentração salina e (F3) tipo de agitação. Para cada um dos fatores foram estudados dois níveis, nível máximo (+) e nível mínimo (-), conforme representado na Tabela 1.3.

**Tabela 1.3** - Planejamento fatorial  $2^3$  para avaliação de três fatores: F1 - proporção dos solventes da mistura extratora, F2 - força iônica e F3 – tempo de agitação, na porcentagem de extração dos agrotóxicos em amostras de água

Ensaio	Fatores codificados			Fatores originais		
	F(1)	F(2)	F(3)	(1) Proporção H <sub>2</sub> O:ACN:A <sub>c</sub> E <sub>t</sub>	(2) Conc. salina (mol L <sup>-1</sup> )	(3) Tipo de agitação
1 e 2	-	-	-	4,5/5,0/1,5 (A)	1,00	Vortex (40'')
3 e 4	+	-	-	3,0/5,0/1,0 (B)	1,00	Vortex (40'')
5 e 6	-	+	-	4,5/5,0/1,5 (A)	2,00	Vortex (40'')
7 e 8	+	+	-	3,0/5,0/1,0 (B)	2,00	Vortex (40'')
9 e 10	-	-	+	4,5/5,0/1,5 (A)	1,00	Mesa Agit. (10')
11 e 12	+	-	+	3,0/5,0/1,0 (B)	1,00	Mesa Agit. (10')
13 e 14	-	+	+	4,5/5,0/1,5 (A)	2,00	Mesa Agit. (10')
15 e 16	+	+	+	3,0/5,0/1,0 (B)	2,00	Mesa Agit. (10')

F1 = Proporção v/v (água:acetonitrila:acetato de etila), F2 = Concentração de NaCl (mol L<sup>-1</sup>) e F3 = Tipo de agitação

Como se trata de um experimento  $2^3$  foram realizados 8 experimentos com uma repetição totalizando 16 ensaios. Em frasco de vidro transparente com tampa, de 22,0 mL de capacidade foram adicionados 4,50 mL ou 3,0 mL de água destilada fortificada com quantidades conhecidas dos princípios ativos de modo que a concentração dos resíduos na mistura final fosse igual a 0,1 mg L<sup>-1</sup>. Em seguida, foram adicionadas misturas extratoras (5,0 mL de acetonitrila/1,5 mL de acetato de etila) ou (5,0 mL acetonitrila/1,0 mL de acetato de etila) correspondente aos níveis (-) e (+). Foram acrescentados 1,0 mL de solução de NaCl 1,0 ou 2,0 mol L<sup>-1</sup>, correspondentes aos níveis (-) e (+), respectivamente,

A mistura obtida foi mantida em agitação por 40 segundos no vórtex ou em uma mesa agitadora, por 10 minutos a 25 °C e a 175 oscilações por minuto, correspondentes aos níveis (-) e (+), respectivamente. Após a agitação, as

soluções foram mantidas em repouso e a fase orgânica superior contendo os analitos de interesse foi retirada com pipeta automática e os volumes dos extratos foram ajustados, com acetonitrila, em balões volumétricos de 5,0 mL contendo 100  $\mu\text{L}$  de solução padrão de bifentrina a 5,0 mg L<sup>-1</sup> (padrão interno) e analisado por CG-DCE.

### 1.3.7. Análise Cromatográfica

A análise qualitativa e quantitativa dos princípios ativos estudados foi realizada em um cromatógrafo a gás da Shimadzu (GC-2014) com detector por captura de elétrons (DCE), equipado com auto-injetor AOC-20i. A fim de estabelecer condições ótimas de análise, alguns parâmetros analíticos foram otimizados: temperatura da coluna, do injetor e detector, vazão dos gases e escolha do tipo de coluna cromatográfica visando um menor tempo de análise e separação entre os picos dos compostos de interesse.

A seguir encontram-se as características da coluna cromatográfica utilizada durante todo processo e as condições analíticas fixadas:

- Coluna capilar HP-5 da Agilent Technologies, com fase estacionária composta de 5% fenil e 95% dimetilsiloxano, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,1  $\mu\text{m}$  de espessura do filme
- Programação da coluna: 150 °C  $\xrightarrow{20\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}}$  250 °C  $\xrightarrow{10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}}$  290 °C (5 min)
- Tempo total de análise: 14 minutos
- Temperatura do injetor: 280 °C
- Temperatura do detector (DCE): 300 °C
- Volume injetado: 1,0  $\mu\text{L}$
- Gás de arraste: Nitrogênio
- Vazão do gás de arraste: 1,2 mL min<sup>-1</sup>
- Divisão de fluxo: 1:5

### 1.3.8. Validação do método analítico

Com o objetivo de assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos, foram delineados procedimentos de validação do processo analítico

empregado. A análise dos critérios de validação foi baseada na 2ª revisão do documento (DOQ-CGCRE-008) do INMETRO denominado “Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos” de junho de 2007 e da ANVISA (RESOLUÇÃO-RE N<sup>o</sup> 899 de 29 de maio de 2003). Os critérios considerados, neste estudo, para validação do método de extração líquido-líquido com partição induzida por sal e análise por CG-DCE foram: seletividade, linearidade de resposta do detector e do método, precisão, exatidão e limite de detecção e quantificação.

#### **1.3.8.1. Seletividade**

A seletividade foi avaliada comparando-se os cromatogramas dos extratos obtidos após extração das matrizes de água isentas dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina com os cromatogramas dos extratos de matrizes de água fortificadas e analisadas conforme o procedimento otimizado.

#### **1.3.8.2. Linearidade de resposta do detector**

A linearidade de resposta do detector foi determinada pela injeção de soluções padrão dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina em acetonitrila com concentrações decrescentes: 750, 500, 250, 100, 50, 25, 10 e 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  e em concentrações menores até observar a relação sinal ruído nas proporções 3:1 para limite de detecção (LD) e 10:1 para o limite de quantificação (LQ) do equipamento. Em todas as soluções foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da solução do padrão interno bifentrina 5,0  $\text{mg L}^{-1}$ , e o volume do balão volumétrico, completado com acetonitrila para 5,0 mL. Cada nível de concentração foi injetado três vezes no CG-DCE a fim de melhorar a qualidade da informação. Após a análise cromatográfica, foram construídas curvas analíticas para cada princípio ativo, correlacionando a razão da área do padrão e a área do padrão interno com as concentrações dos compostos estudados.

### 1.3.8.3. Limite de detecção e limite de quantificação do método de extração líquido-líquido com partição induzida por sal (ELL- PIS)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método proposto foram determinados pela relação sinal-ruído, sendo consideradas as proporções de 3:1 para LD e 10:1 para LQ. Este método pode ser aplicado em procedimentos analíticos que apresentam ruído da linha de base e é estimado a partir da comparação do sinal analítico obtido para uma amostra contendo baixas concentrações da espécie de interesse com o sinal de uma amostra do branco. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância de interesse pode ser detectada e quantificada com confiabilidade (ICH, 1996; RIBANI *et al.*, 2007).

Para se determinar o LD e LQ, as amostras de água (3,0 mL) foram fortificadas com 100 µL da solução padrão contendo os princípios ativos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina em 7 níveis diferentes de concentrações e passados pelo método de extração otimizado. O extrato foi recuperado em balão volumétrico de 5,0 mL contendo o padrão interno na concentração de 30,0 µg L<sup>-1</sup>. Após esta etapa foram realizadas várias injeções dos extratos, de matrizes fortificadas, em concentrações decrescentes, sendo de 6,0; 5,0; 4,0; 3,0; 2,0; 1,0 e 0,6 µg L<sup>-1</sup> para o clorpirifós; 450,0; 400,0; 325, 0; 250, 0; 175,0; 100,0; e 45, 0; µg L<sup>-1</sup> para o tiametoxam; 60,0; 50,0; 40,0; 30, 0; 20,0; 10,0; e 6,0; µg L<sup>-1</sup> para a cipermetrina e 150,0; 125,0; 100,0; 75,0; 50, 0; 30 e 15, 0; µg L<sup>-1</sup> para o agrotóxico deltametrina, respectivamente.

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Foram injetados também extratos em concentrações inferiores ao menor valor de concentração citado para cada composto acima, de modo que a concentração que proporcionou um sinal três vezes maior que o ruído da linha de base foi estabelecido como sendo o limite de detecção e um sinal dez vezes maior que o ruído, o limite de quantificação (ICH, 1996; COLLINS *et al.*, 2006).

#### **1.3.8.4. Precisão**

A precisão do método extração líquido-líquido com partição induzida por sal para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de água foi avaliada sob condições de repetitividade e precisão intermediária.

##### **1.3.8.4.1. Repetitividade**

A repetitividade do método ELL-PIS para os quatro agrotóxicos estudados em amostras de água foram determinadas seguindo o procedimento otimizado (item 1.3.3), realizando sete extrações para a estimativa do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV), conforme sugerido pelo INMETRO (2007). As amostras foram fortificadas com 100 µL de solução padrão de modo que a concentração final obtida para cada agrotóxico estudado fosse igual a 6 vezes o LQ do método obtido para cada composto.

##### **1.3.8.4.2. Precisão intermediária**

Para avaliar a precisão intermediária, foram realizadas sete extrações nas mesmas condições preparadas para o estudo de repetitividade, e em três dias distintos (1º, 7º e 30º). Essas análises foram realizadas pelo mesmo analista, no mesmo laboratório, empregando também o mesmo instrumento de análise. O efeito deste parâmetro foi avaliado através da porcentagem de recuperação e do coeficiente de variação.

#### **1.3.8.5. Exatidão**

Dentre os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método estão os ensaios de recuperação e a comparação de métodos. Os dois processos foram utilizados neste trabalho.

### 1.3.8.5.1. Ensaios de recuperação

Os ensaios de recuperação consistiram em fortificar amostras de água com 100,0 µL de soluções padrão concentradas nos diferentes níveis: 0,015; 0,045; 0,090 e 0,18 mg L<sup>-1</sup> para o agrotóxico clorpirifós; 0,55; 1,65; 3,30 e 6,60 mg L<sup>-1</sup> para o tiametoxam; 0,15; 0,45; 0,90 e 1,80 mg L<sup>-1</sup> para a cipermetrina; 0,36; 1,08; 2,16 e 4,32 mg L<sup>-1</sup> para a deltametrina, de modo que os extratos recuperados em balões de 5,0 mL estivessem em concentrações equivalentes a 1, 3, 6 e 12 vezes o limite de quantificação do método, respectivo a cada princípio ativo. Os cálculos foram estabelecidos levando em consideração os 3,0 mL de água utilizado para cada ensaio.

Estas amostras em triplicatas foram submetidas ao método de ELL-PIS conforme descrito no item 1.4.3 e os extratos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa nas condições ótimas estabelecidas. Os valores das recuperações obtidas nos ensaios foram utilizados para analisar este parâmetro, onde a exatidão foi avaliada pela porcentagem de recuperação do método.

### 1.3.8.5.2. Comparação de métodos

Os resultados obtidos para os compostos de interesse empregando-se o método ELL-PIS otimizado foram comparados com dois métodos de extração líquido-líquido afim de verificar o grau de proximidade entre os resultados fornecidos. Todas as amostras de água foram fortificadas de modo que o extrato final obtivesse uma concentração igual a seis vezes o limite de quantificação do método equivalente a cada princípio ativo. A metodologia utilizada tanto para o método 1 e 2 estão descritas abaixo.

#### **Método 1:**

Esta metodologia denominada extração líquido – líquido e partição em baixa temperatura (ELL-PBT) foi desenvolvida por Vieira *et al.*, (2007) para extração de piretróides em água. Em frasco de vidro transparente com tampa e septo de teflon foram adicionados 4,00 mL de água contendo 0,020 mol L<sup>-1</sup> de íon sódio, previamente fortificada com uma solução padrão contendo os quatro

agrotóxicos estudados. Logo após adicionaram-se 6,50 mL de acetonitrila e 1,50 mL de acetato de etila, seguida de agitação por 15 minutos em mesa agitadora.

Após agitação as amostras de água foram deixadas em freezer a aproximadamente -20 °C por 12 horas. Após este período, a fase orgânica líquida superior foi passada por um papel de filtro com sulfato de sódio anidro, sendo o papel de filtro previamente lavado com acetonitrila resfriada a - 20 °C. Os volumes dos extratos foram ajustados para 8,00 mL de acetonitrila e armazenados em freezer até o momento da determinação por cromatografia gasosa.

## **Método 2:**

Essa metodologia foi proposta por VIÑAS *et al.*, (2002) para extração de agrotóxicos na água. Foi realizada uma extração líquido-líquido de 25,0 mL de água, previamente fortificada e contendo 10% de NaCl, com 125,0 mL de acetato de etila, em um funil de separação, seguida de agitação por 10 minutos. Posteriormente, a fase orgânica foi separada da aquosa e o funil de separação foi lavado com 10,00 mL de acetato de etila. As fases orgânicas foram coletadas em um balão volumétrico de fundo redondo e concentradas em um evaporador rotativo a vácuo e, em seguida, recuperadas em 8,00 mL de acetonitrila.

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Os extratos foram transferidos para frascos de vidro e armazenados em freezer até o momento da análise cromatográfica.

### **1.3.9. Determinação dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, deltametrina e cipermetrina em amostras naturais e avaliação do efeito de matriz**

Foram coletadas amostras de água em rios da Zona da Mata Mineira, nos municípios de Manhuaçu, Matipó, Raul Soares e em um córrego em São José do Goiabal. A coleta foi realizada nos períodos de junho a julho de 2009, a uma profundidade de  $\pm 50$  centímetros da superfície das águas, em períodos sem chuvas e fora da época de plantio. Informações sobre as aplicações de

agrotóxicos sobre as culturas também foram observadas. Na região de Manhuaçu, Matipó, Raul Soares predomina o cultivo de café e frutas cítricas, já em São José do Goiabal apenas culturas para subsistência.

Dez amostras de água foram coletadas em frascos de vidro, sendo os recipientes previamente higienizados com detergente, enxaguados com água de torneira e destilada, solução alcoólica, e finalmente rinsados por 2 vezes com a própria amostra na hora da coleta, afim de evitar contaminação por fontes externas.

No momento da coleta foram determinadas as condições de pH, temperatura da água, bem como temperatura do ar. As amostras foram colocadas em frascos de vidro âmbar (com capacidade de 1000 mL) fechados com tampas de rosca. Os frascos foram identificados e conservados em caixa de isopor com gelo até o acondicionamento final e mantidos sob refrigeração a 4 °C, até o momento da análise, que foi aproximadamente 48 h após a coleta.

A técnica de ELL- PIS para determinação dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina, foi aplicada nas amostras de água coletadas. Desta forma, consistiu em colocar em frascos de vidro transparente (22 mL) 3,00 mL da amostra de água e acrescentados 5,0 mL de acetonitrila e 1,0 mL de acetato de etila, formando uma fase única. Para romper a fase única foi acrescentado 1,0 mL de solução de NaCl 2,0 mol L<sup>-1</sup> (efeito *salting out*).

As misturas foram homogeneizadas em vórtex por 40 segundos e mantidas em repouso (cerca de um minuto), formando um sistema bifásico. A fase orgânica superior foi retirada com pipeta automática e recuperada em balão volumétrico de 5,0 mL, onde o excesso de extrato recolhido ( $\pm 0,3$  mL) foi evaporado sob ação de nitrogênio e armazenados no freezer para posterior análise por cromatografia gasosa.

### **São José do Goiabal**

Ponto 1 – Córrego Açude (antes da cidade)

Ponto 2 – centro da cidade

Ponto 3 – Encontro dos córregos – final da cidade

### **Manhuaçu**

Ponto 1 – Córrego Martinha (Ponte do Posto Bazém)

Ponto 2 – Rio Manhuaçu (Vila Deolinda / Ponte estreita)

Ponto 3 – Rio Manhuaçu (Ponte do Engenho da Serra)

Foram coletadas duas amostras de água no Rio Santana na cidade de Raul Soares e duas no Rio Matipó da cidade de Matipó. Os pontos 1 e 2 de coleta das amostras de água destes rios se encontram no início e término das cidades.

Também foram coletadas duas amostras de água de torneira, que foram submetidas ao mesmo método. No intuito de eliminar as impurezas e a água acumulada na rede de distribuição, a torneira ficou aberta alguns instantes antes da coleta. Em frascos previamente higienizados foram coletadas uma amostra no laboratório de química analítica - LAQUA e outra em domicílio particular, com o objetivo de averiguar a possível presença dos agrotóxicos em estudo.

## 1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

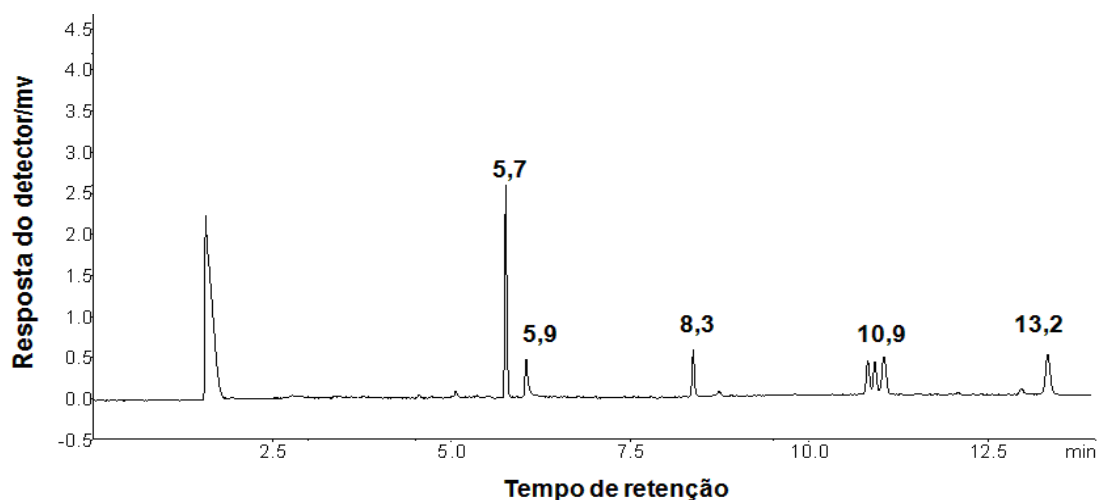
### 1.4.1. Análise Cromatográfica

Os métodos cromatográficos são os mais empregados nas etapas de separação, identificação e quantificação de agrotóxicos, sendo a cromatografia em fase gasosa (CG) a mais utilizada para identificação e quantificação de compostos voláteis ou volatilizáveis (VAN DER & VAN ZONEN, 1999).

Para análise dos resíduos de agrotóxicos nos extratos de água, foi utilizada cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons. O detector por captura de elétrons (DCE) apresenta alta sensibilidade aos compostos halogenados, possibilitando a quantificação dos princípios ativos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina.

Primeiramente, foi injetada separadamente soluções padrão preparadas em acetonitrila correspondente a cada princípio ativo, a fim de averiguar qual seria o tempo de retenção de cada composto analisado. Nas condições cromatográficas estabelecidas foi injetada uma solução padrão contendo todos os compostos em estudo, simultaneamente. As condições de análise como, programação de temperatura da coluna utilizada e o fluxo do gás de arraste, descritas no item 1.3.7 permitiram separar adequadamente as substâncias avaliadas em um tempo relativamente curto (14 min).

Na Figura 1.7 está representado um cromatograma de uma solução padrão dos agrotóxicos, em acetonitrila, a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os picos com tempos de retenção ( $t_R$ ) iguais a 5,7; 5,9; 10,9 e 13,2 minutos correspondem ao clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina, respectivamente. O pico com tempo de retenção ( $t_R$ ) igual a 8,3 minutos corresponde ao padrão interno bifentrina.



**Figura 1.7** - Cromatograma de uma solução padrão de  $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$  dos princípios ativos em acetonitrila, onde:  $t_R = 5,7$  min: clorpirifós,  $t_R = 5,9$  min: tiametoxam,  $t_R = 8,3$  min: bifentrina (PI)  $t_R = 10,9$  min: cipermetrina e  $t_R = 13,2$  min: deltametrina.

A presença de mais de um pico para os piretróides cipermetrina e deltametrina ( $T_R = 10,9$  e  $T_R = 13,2$ ) é atribuída à conversão em isômeros durante a injeção das amostras no cromatógrafo a gás (MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004). Dessa maneira, a quantificação desses piretróides foi realizada considerando-se a soma das áreas dos picos dos seus isômeros.

#### **1.4.2. Otimização da técnica de Extração Líquido-Líquido com Partição Induzida por Sal (ELL- PIS)**

##### **1.4.2.1. Avaliação da eficiência da mistura extratora água/acetonitrila/acetato de etila na recuperação dos agrotóxicos**

ANASTASSIADES *et al.* (2003) afirmam que na escolha do solvente mais adequado para a extração líquido-líquido em fase única, devem ser considerados aspectos como a miscibilidade em água e a seletividade do solvente. A miscibilidade em água está diretamente relacionada com a maior habilidade de formação de fase única e posterior formação de duas fases, seja pela adição de sais, solventes não polares, ou por abaixamento de temperatura.

A acetonitrila é considerada um dos melhores solventes de extração de agrotóxicos. A acetonitrila por ser miscível em água, forma uma fase única em qualquer proporção. A polaridade da acetonitrila pode ser reduzida pela adição de solventes menos polares, como é o caso do acetato de etila, onde a extração dos agrotóxicos menos polares (piretróides) pode ser aumentada através desta combinação (MASTOVSKA & LEHOTAY, 2004)

Em um estudo realizado por Vieira *et al.* (2007) foi determinado que para a proporção 1:2, fase aquosa:fase orgânica, para manter o sistema em fase única, o volume máximo de acetato de etila que poderia ser adicionado em 8,0 mL de fase orgânica seria 1,5 mL. Portanto, volumes maiores levam ao rompimento do equilíbrio e formação de duas fases. Neste sentido, foram realizados neste trabalho testes, a fim de se estabelecer a proporção ideal entre o volume de água, acetonitrila e acetato de etila que alcançasse a melhor recuperação dos princípios ativos na matriz água pela técnica ELL- PIS e simultaneamente não rompesse o equilíbrio da fase única. Para cada mistura de solventes foi avaliada a porcentagem de extração e os seus respectivos coeficientes de variação (Tabela 1.4) dos agrotóxicos clorpirifós, thiamethoxam, cipermetrina e deltametrina presentes em amostras de água.

**Tabela 1.4** - Porcentagens de recuperação (%R) e coeficiente de variação, CV (%), obtidos na análise dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina dos extratos orgânicos utilizando diferentes proporções entre os volumes de amostra:volumes na mistura extratora

Proporção*:	Clorpirifós		Thiamethoxam		Cipermetrina		Deltametrina	
	%R	CV (%)	%R	CV (%)	%R	CV (%)	%R	CV (%)
4,5/5,0/1,5 (A)	90,3	2,9	75,3	9,7	71,2	3,0	79,6	5,5
<b>3,0/5,0/1,0 (B)</b>	<b>88,9</b>	<b>2,2</b>	<b>65,6</b>	<b>6,4</b>	<b>84,6</b>	<b>3,3</b>	<b>85,6</b>	<b>5,2</b>
4,5/5,5/1,5 (C)	88,6	1,6	47,8	8,7	73,7	19,2	69,8	21,1
4,5/6,0/1,5 (D)	78,3	20,2	67,6	22,4	82,2	5,5	85,3	15,8
4,0/4,0/1,0 (E)	74,3	1,4	44,6	12,2	61,0	20,0	64,0	10,5
3,0/6,0/1,0 (F)	87,6	7,8	45,1	0,5	70,3	12,9	76,9	14,5

\*Proporção (água:acetonitrila:acetato de etila)

Embora os resultados não sejam conclusivos eles permitem inferir que a proporção amostra:solvente extrator que produz melhores resultados é a de 1:2 ou bem próxima dela (1:1,4)

As melhores porcentagens de recuperação para todos os compostos foram obtidas quando se utilizou as proporções A e B, no entanto a proporção B (3,0 mL de água: 5,0 mL de acetonitrila e 1,0 mL de acetato de etila) foi escolhida para dar continuidade a próxima etapa do estudo, devido ao fato de ter apresentado menor dispersão das médias.

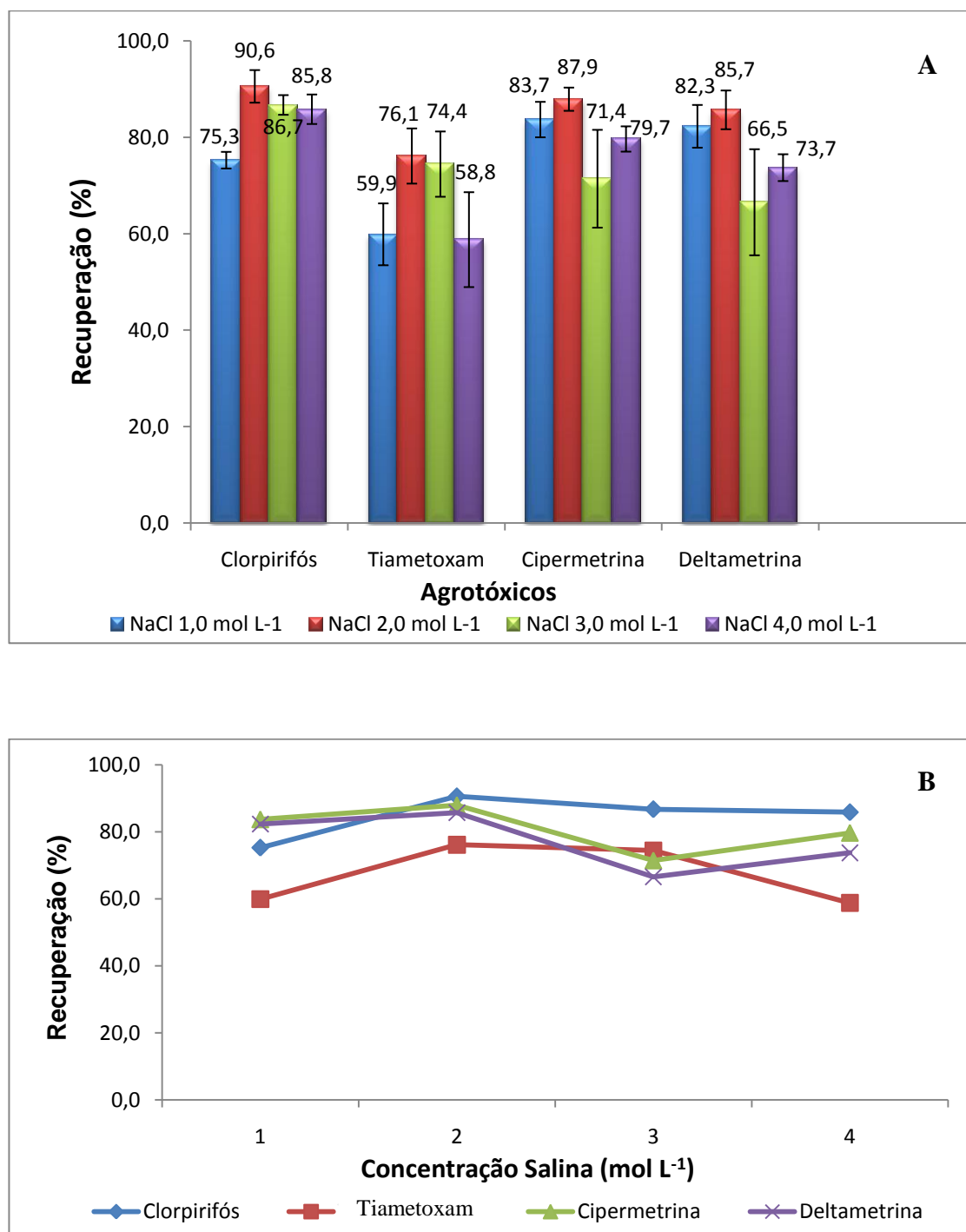
A proporção 1:2 (amostra: solvente extrator), também foi a proporção ideal para extração de piretróides em água quando Vieira et al (2007) utilizou a técnica ELL-PBT.

#### **1.4.2.2. Valores de Recuperação dos agrotóxicos sob efeito da concentração salina**

O particionamento de pesticidas entre as 2 fases depende das diferenças de polaridade das fases superior e inferior. Tipicamente, os compostos polares preferem a camada aquosa, enquanto os compostos não polares são extraídos na camada orgânica. A concentração salina e o tipo de íons utilizados produzem diferentes graus de separação das fases. Assim a adição de sal na amostra apresenta maior influência para agrotóxicos polares (MAJORS 2009).

A adição de NaCl em solução aquosa normalmente ocasiona um efeito positivo, pois ocorre solvatação dos íons pelas moléculas de água facilitando a migração dos analitos para a fase orgânica (PAWLISZIN,1997). Este efeito da adição de sal é conhecido como “salting out”, e pode ocasionar uma diminuição da solubilidade de determinados analitos na fase aquosa, o que favorece a extração.

Para determinação da concentração salina ideal foram preparadas soluções aquosas nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mol L<sup>-1</sup> de NaCl e adicionados 1,0 mL em frascos contendo a amostra de água fortificada com os agrotóxicos e a mistura extratora. Nessa avaliação foi utilizada a proporção amostra:acetonitrila:acetato de etila de 3,0:5,0:1,0 em função dos resultados anteriores. Em seguida a mistura foi agitada por 40s no vórtex. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 1.8 (A e B).



**Figura 1.8 (A e B)** - Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina com adição de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mol L<sup>-1</sup> de solução de NaCl durante o processo de extração.

Verificou-se que nas roporções amostra: acetonitrila: acetato de etila de 3,0: 5,0: 1,0 e adição de 1,0 mL de solução salina 0,5 mol<sup>-1</sup> não foi suficiente para romper o equilíbrio e formar sistema bifásico.

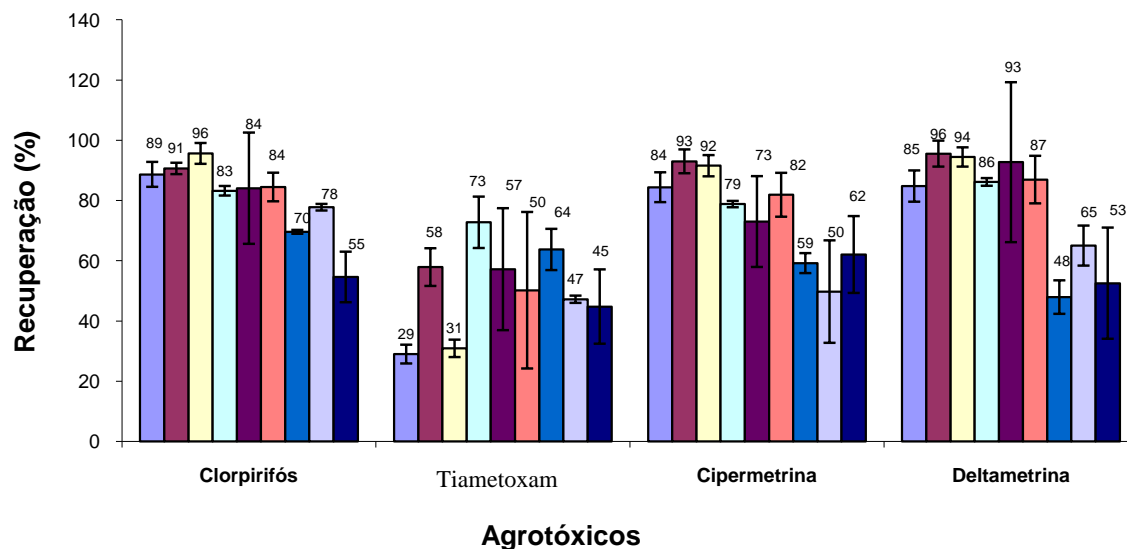
Pelos resultados mostrados na Figura 1.8 pôde-se verificar que a utilização de solução salina em concentrações superiores a  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  não aumentou a porcentagem de recuperação dos compostos estudados, além de apresentarem maior dispersão das médias. Observou-se também que não existe diferença significativa no rendimento de extração para os piretróides cipermetrina e deltametrina quando se utilizou as concentrações  $1,0$  e  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ , mas em contra partida a concentração  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  apresentou um efeito positivo para o organofosforado clorpirifós e o neonicotinóide tiametoxam. Concentrações superiores a  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  diminuiram o rendimento da extração dos piretróides deltametrina e cipermetrina.

Quando se utilizou solução de sacarose no processo de *sugaring out* os rendimentos foram inferiores quando comparado á adição de NaCl e maior ruído da linha de base dos cromatogramas. Portanto é importante destacar que o aumento da concentração salina é benéfico até certo ponto e a porcentagem de recuperação dependerá das propriedades do analito estudado. A concentração salina  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  foi escolhida como melhor condição para dar continuidade aos estudos.

#### **1.4.2.3. Efeito da forma e tempo de agitação das amostras na porcentagem de extração dos analitos das amostras de água**

Nesta etapa do experimento variou-se a forma e o tipo de agitação afim de verificar o efeito destes parâmetros no rendimento de extração dos princípios ativos. Os outros parâmetros como solvente extrator e concentração salina foram mantidos constantes.

Desta forma, as amostras foram submetidas a três tipos diferentes de agitação (vórtex por 20 s, 40 s e 1 min; mesa agitadora por 10, 20 e 30 min; ultrassom por 5, 10 e 15 min). Posteriormente, as amostras foram mantidas em repouso o tempo suficiente para que ocorresse a separação da fase orgânica e aquosa. As porcentagens de recuperação estão apresentadas na Figura 1.9.



■ V 20 s ■ V 40 s ■ V 1 min ■ MA 10 min ■ MA 20 min ■ MA 30 min ■ US 5 s ■ US 10 s ■ US 15 s

**Figura 1.9** – Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina de amostras de água em função do processo de homogeneização (V = vórtex; MA = mesa agitadora; US = Ultrassom) da mistura após rompimento do equilíbrio pela adição de solução salina.

Os resultados mostram que a homogeneização em vórtex apresentou melhores rendimentos e menores dispersões das médias para o clorpirifós, cipermetrina e deltametrina. O tempo de 40 segundos de agitação em vórtex foi suficiente para extrair eficientemente os compostos de interesse. A agitação por 10 minutos em mesa agitadora apresentou um efeito positivo para o tiametoxam. Quando utilizou a mesa agitadora em tempos superiores a 10 minutos ocorreu uma maior variação da média, além de não ter aumentado de forma significativa a porcentagem de recuperação dos analitos.

O modo de agitação em ultrassom foi pouco satisfatório para ambos compostos, sendo que a porcentagem média de recuperação variou de 45 a 75%, além de apresentarem menor precisão dos dados. De forma geral, os maiores tempos utilizados para ambas as formas de agitação não aumentou a porcentagem de recuperação dos compostos em estudo, além de ter proporcionado uma maior dispersão dos resultados.

Após a avaliação dos resultados, foi selecionado o tempo de agitação em vórtex por 40 segundos e mesa agitadora por 10 minutos como fatores para serem utilizados no planejamento fatorial  $2^3$ , pois apresentaram melhores taxas

de recuperação para a maioria dos compostos de interesse. A aplicação do planejamento fatorial  $2^3$  teve como principal objetivo aumentar a porcentagem de extração do tiametoxam, visto que esta se encontrava inferior aos outros agrotóxicos estudados.

#### 1.4.2.4. Planejamento fatorial $2^3$

Os experimentos que visam investigar os efeitos de vários fatores sobre uma determinada resposta normalmente são efetuados, pelo método fator único, ou univariado, em que um único fator é alterado e analisado separadamente em cada experimento, enquanto os demais permanecem constantes. Porém, a idéia mais atual é a de que todos os fatores sejam variados simultaneamente, principalmente, para avaliar a existência de possíveis interações entre eles (EIRAS & ANDRADE, 1996).

O planejamento fatorial é uma importante ferramenta estatística e, devido à sua simplicidade, vem sendo cada vez mais utilizado pelos químicos analíticos para diferentes amostras e propósitos, pois possibilita a interpretação dos resultados considerando todos os parâmetros experimentais envolvidos. (COSTA *et al.*, 2006). Além disso, o planejamento permite avaliar as possíveis interações entre os fatores e sua influência na resposta.

Para avaliar a influência de algumas variáveis no rendimento de extração dos agrotóxicos, o método foi otimizado empregando um planejamento fatorial  $2^3$ . Os fatores: (F1) proporção entre os volumes de água e solvente extrator (acetonitrila/acetato de etila); (F2) concentração salina (1,0 e 2,0 mol L<sup>-1</sup> de NaCl) e (F3) tipo de agitação (40 s no vórtex ou 10 min de agitação mecânica) foram avaliados. Como o experimento envolvia 3 fatores com dois níveis cada um ( $2^3$ ), a execução do planejamento foi realizada em 8 ensaios, com todas as possíveis combinações dos níveis (+) e (-). Os ensaios, realizados em duplicata, geraram 16 respostas que permitiram calcular as porcentagens de recuperação média dos agrotóxicos em amostras de água fortificada.

Na Tabela 1.5, encontram-se destacados os ensaios que obtiveram as melhores porcentagens de recuperação para os quatro agrotóxicos analisados em amostras de água.

**Tabela 1.5** - Porcentagens de recuperação média e estimativa do erro experimental, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de água contendo os agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina submetido à extração líquido líquido com partição induzida por sal.

Ensaio	Fatores codificados			Recuperação (%) ± estimativa do desvio padrão			
	F(1)	F(2)	F(3)	Clorpirifós	Tiametoxam	Cipermetrina	Deltametrina
1 e 2	-	-	-	89,3 ± 8,1	50,0 ± 11,7	68,6 ± 10,1	72,3 ± 10,7
3 e 4	+	-	-	67,1 ± 6,0	48,7 ± 10,6	69,9 ± 8,0	72,1 ± 0,6
5 e 6	-	+	-	85,5 ± 3,5	67,4 ± 16,4	75,9 ± 9,3	84,9 ± 18,7
<b>7 e 8</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>88,9 ± 0,2</b>	<b>65,5 ± 3,4</b>	<b>92,7 ± 8,9</b>	<b>90,1 ± 4,7</b>
9 e 10	-	-	+	84,3 ± 6,9	56,5 ± 23,3	73,1 ± 2,1	63,2 ± 21,7
11 e 12	+	-	+	78,7 ± 1,0	65,8 ± 17,1	42,5 ± 18,5	57,0 ± 4,8
13 e 14	-	+	+	51,7 ± 6,7	49,2 ± 14,3	56,3 ± 0,8	57,2 ± 7,9
15 e 16	+	+	+	70,3 ± 2,6	52,6 ± 5,6	72,1 ± 6,6	81,3 ± 1,0

F1 = Proporção v/v (água:acetona:acetato de etila), F2 = Concentração de NaCl (mol L<sup>-1</sup>) e F3 = Tipo de agitação

Com o auxílio dos programas *Microsoft Excel* e *Microcal Origin* foi possível calcular as porcentagens de recuperação média, os efeitos de cada fator e as interações entre os fatores na extração dos agrotóxicos em amostras de água, os quais estão apresentados na Tabela 1.6. Foi realizado o teste t (Student) para  $\alpha = 0,05$  e  $\nu = 8$ , ou seja, no nível de 95 % de confiança o valor de t correspondente a 8 graus de liberdade é 2,306. Isso quer dizer que só serão considerados estatisticamente significativos, os efeitos cujos valores de  $t_{\text{calculado}}$  sejam maiores que 2,306.

**Tabela 1.6** - Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores ( $\pm$  estimativa do erro experimental) na extração de cada um dos agrotóxicos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de água.

	Clorpirifós	Tiametoxam	Cipermetrina	Deltametrina
Recuperação média	76,46 $\pm$ 1,26	57,0 $\pm$ 3,23	68,87 $\pm$ 2,37	72,26 $\pm$ 2,56
(1) Prop. (H <sub>2</sub> O: solv)	-2,50 $\pm$ 2,52	2,38 $\pm$ 6,46	0,82 $\pm$ 4,74	5,755 $\pm$ 5,12
(2) Conc. salina	<b>- 6,77 <math>\pm</math> 2,52*</b>	3,42 $\pm$ 6,46	10,69 $\pm$ 4,74	<b>12,19 <math>\pm</math> 5,12*</b>
(3) Tipo de agitação	<b>-12,47 <math>\pm</math> 2,52*</b>	-1,84 $\pm$ 6,46	<b>-15,77 <math>\pm</math> 4,74*</b>	<b>-15,18 <math>\pm</math> 5,12*</b>
(1) e (2)	<b>11,47 <math>\pm</math> 2,52*</b>	-1,65 $\pm$ 6,46	<b>15,48 <math>\pm</math> 4,74*</b>	8,94 $\pm$ 5,12*
(1) e (3)	<b>6,88 <math>\pm</math> 2,52*</b>	3,95 $\pm$ 6,46	-8,21 $\pm$ 4,74	3,24 $\pm$ 5,12
(2) e (3)	<b>-15,78 <math>\pm</math> 2,52*</b>	-13,68 $\pm$ 6,46	-4,36 $\pm$ 4,74	-3,04 $\pm$ 5,12
(1) , (2) e (3)	-1,40 $\pm$ 2,52	-1,34 $\pm$ 6,46	7,69 $\pm$ 4,74	6,23 $\pm$ 5,12

\*(Em negrito) Efeito estatisticamente significativo ao nível de 95% de probabilidade pelo teste t ( $t_{\text{tab}} > t_{0,05} = 2,306$ )

Quando se avança ao longo do planejamento de um nível inferior (-) para o nível superior (+), pode ocorrer um aumento ou decréscimo nos percentuais de recuperação dos agrotóxicos em estudo.

Os resultados obtidos do planejamento fatorial mostram que a proporção entre a amostra e a mistura extratora não causa efeitos significativos na porcentagem de recuperação, no intervalo entre os níveis avaliados. A variação de concentração salina, nos níveis avaliados, causou efeito significativo para extração do clorpirifós e deltametrina. Esse efeito foi positivo para a deltametrina e negativo para o clorpirifós. A forma de agitação utilizada para homogeneizar a mistura teve efeito negativo e significativo para extração de todos os agrotóxicos, exceto para o tiametoxam.

Em relação aos agrotóxicos clorpirifós e cipermetrina foi observado a existência de efeitos secundários (Tabela 1.6). O efeito secundário para o composto clorpirifós é decorrente da interação entre os fatores: 1:2, 1:3 e 2:3, já para cipermetrina é devido á interação 1:2.

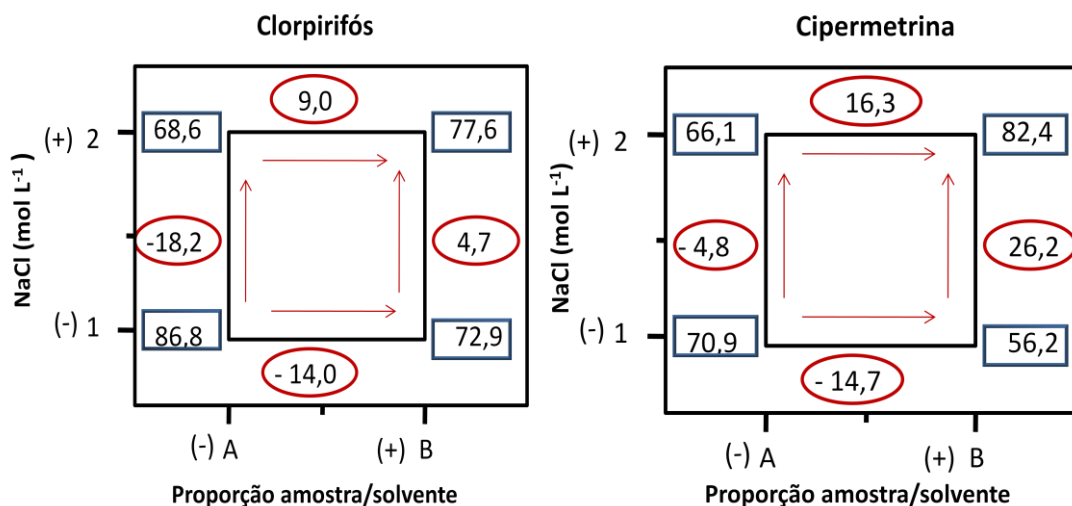
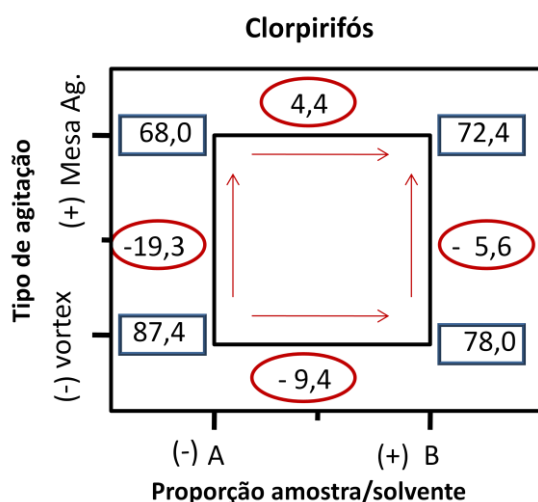
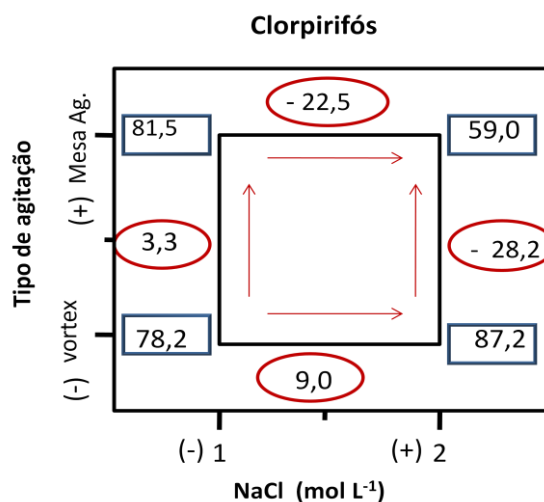
Estes efeitos de interação podem ser mais facilmente visualizados com os valores médios mostrados na Figura 1.10. A representação geométrica foi dada através de um diagrama de planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, pois as interações foram observadas somente entre dois fatores.

Os valores numéricos percentuais dentro dos quadrados (Figura 1.10), representam a eficiência de recuperação medida pelo método de extração e análise por cromatografia gasosa e as setas apontam para as tendências de maior eficiência. Os valores que estão no centro dos quadrados são as médias de recuperação obtidas, e os que estão dentro dos círculos correspondem à diferença entre as médias. Nesta representação foram consideradas somente as interações dos efeitos significativos.

A utilização de solução salina  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  ( $F_2$ , nível +) ao invés de solução salina  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  ( $F_2$ , nível -), numa proporção água/mistura extratora A ( $F_1$ , nível -) causou um decréscimo no rendimento de extração em 18,2% para o clorpirifós e 4,8% para cipermetrina. Utilizando a proporção água/mistura extratora B ( $F_1$ , nível +), a alteração de solução salina para  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  causou um aumento no rendimento de extração de 4,7% e 26,0% para o clorpirifós e cipermetrina respectivamente. Na variação da proporção A para B utilizando solução salina  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  ocasionou um decréscimo de 14,0 e 14,7% para os compostos clorpirifós e cipermetrina, respectivamente. Entretanto, quando utilizou a concentração  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  de NaCl nessas mesmas condições, ocorreu um aumento de 9,0%, e 16,3% para os compostos citados acima.

A mudança de vórtex 40s para mesa agitadora 10 min diminuiu o rendimento de extração em 19,3 % para o clorpirifós quando se utilizou a proporção A (água/solvente extrator), já quando utilizou a proporção B o rendimento caiu em 5,6%. Mudando a proporção A para B e utilizando vórtex 40s ocorreu uma diminuição do rendimento em 9,4% para o clorpirifós, mas quando utilizou-se mesa agitadora ocorreu um ganho de 4,4% no rendimento deste composto.

A mudança do tipo de agitação de vórtex 40 s para a agitação mecânica 10 min utilizando solução salina  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  proporcionou um aumento de 3,3% para clorpirifós, entretanto quando se utilizou solução de NaCl  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  e agitação por mesa agitadora ocorreu um decréscimo de 28,2% para este composto. A variação da concentração salina de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  para  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  sob agitação em vórtex 40 s ocasionou um acréscimo de 9,0% na porcentagem de recuperação do clorpirifós, mas quando utilizou mesa agitadora ocorreu um decréscimo de 22,5%.

Interação (F<sub>1</sub>F<sub>2</sub>)Interação (F<sub>1</sub>F<sub>3</sub>)Interação (F<sub>2</sub>F<sub>3</sub>)

**Figura 1.10** - Diagramas para interpretação geométrica dos efeitos de interação observados no planejamento 2<sup>3</sup>.

Pelos resultados obtidos da análise estatística, os ensaios 7 e 8 (Tabela 1.5) apresentaram maiores porcentagens de recuperação e menor dispersão na média para os compostos estudados, comprovando o que havia sido observado nos testes univariados. O planejamento fatorial não contribuiu de forma significativa para aumentar a porcentagem de recuperação do agrotóxico

tiametoxam. Portanto, os fatores proporção amostra: solvente extrator B (3,0 mL de água; 5,0 mL de acetonitrila e 1,0 mL de acetato de etila), concentração de NaCl  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  e agitação em vórtex por 40 s foram escolhidos para dar continuidade ao trabalho.

### **1.4.3. Metodologia otimizada para extração de agrotóxicos em água**

No processo de otimização da metodologia de ELL-PIS para extração dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina nas amostras de água, alguns parâmetros foram avaliados individualmente (análise univariada) e, em seguida, as duas melhores respostas alcançadas para cada parâmetro foram aplicadas em um planejamento fatorial, onde foram avaliadas três variáveis (proporção água:solvente extrator; concentração salina, tipo de agitação) e a interação entre elas.

Desta forma, a metodologia otimizada e aplicada na etapa de validação consistiu em colocar em frascos de vidro transparente (22 mL) 3,00 mL da amostra de água previamente fortificada, 6,0 mL de mistura extratora (5,0 mL de acetonitrila e 1,0 mL de acetato de etila), formando uma fase única. Para romper este equilíbrio foi acrescentado 1,0 mL de solução de NaCl  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  (efeito *salting out*).

As misturas foram homogeneizadas em vórtex por 40 segundos e mantidas em repouso (cerca de um minuto), formando um sistema bifásico. A fase orgânica superior foi retirada com pipeta automática e recuperadas em balões volumétricos de 5,0 mL, onde o excesso de extrato recolhido ( $\pm 0,3 \text{ mL}$ ) era evaporado sob ação de nitrogênio e armazenados no freezer para posterior análise por cromatografia gasosa.

### **1.4.4. Validação do método analítico**

O procedimento de validação de métodos deve incluir todas as etapas necessárias para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis. Para avaliar o desempenho do método analítico, vários parâmetros foram considerados, seguindo recomendações do INMETRO

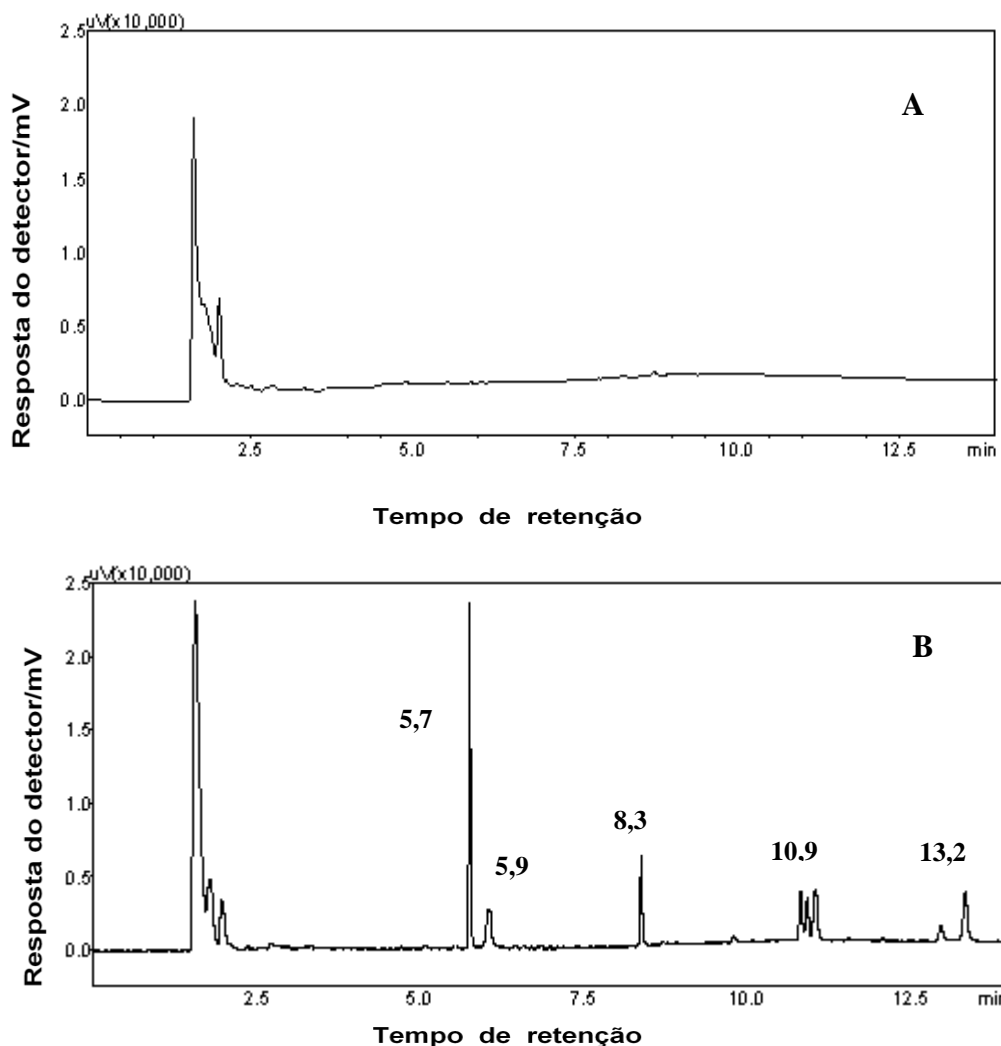
(2007) e ANVISA (2003): seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão (ensaio de recuperação e comparação de métodos) e faixa de trabalho.

#### 1.4.4.1. Seletividade

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). Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas, por isso, a seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação, devendo ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método (RIBANI *et al.*, 2004).

Este parâmetro foi avaliado comparando-se o cromatograma obtido após a extração da matriz água do Rio Manhuaçu isenta dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina com o cromatograma do extrato da matriz fortificada e analisada conforme o procedimento otimizado descrito no item 1.4.3. Através do cromatograma representado na Figura 1.11. A observa-se que não foi detectado nenhum interferente nos tempos de retenção dos princípios ativos de interesse.

A seletividade do método está associada principalmente à seletividade do detector utilizado. Pelo método de extração são obtidos extratos límpidos, isentos de interferentes e as condições cromatográficas e o tipo de coluna utilizada permitiu uma boa separação dos agrotóxicos.



**Figura 1.11** - A) cromatograma do extrato obtido da matriz água do Rio Manhuaçu e B) Cromatograma da amostra de água do Rio Manhuaçu fortificada com  $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$  dos dos agrotóxicos clorpirifós ( $t_R = 5,7 \text{ min}$ ), tiametoxam ( $t_R = 5,9 \text{ min}$ ), padrão interno ( $t_R = 8,3 \text{ min}$ ), cipermetrina ( $t_R = 10,9 \text{ min}$ ) e deltametrina ( $t_R = 13,2 \text{ min}$ ).

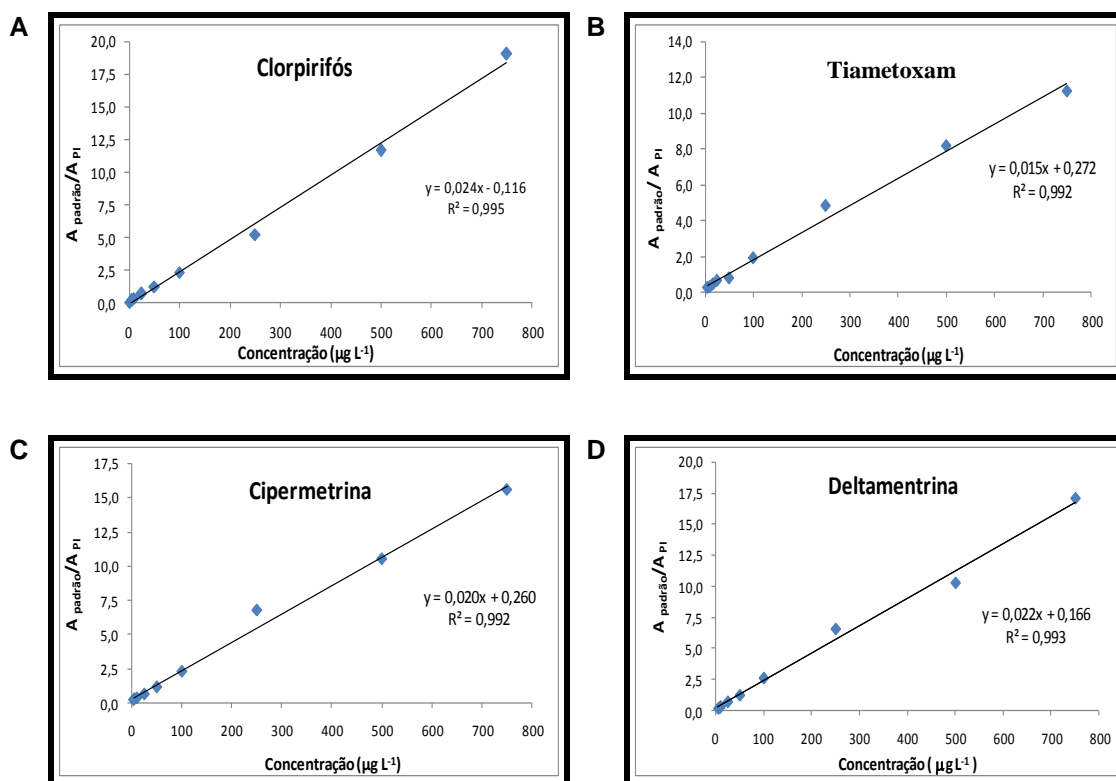
#### 1.4.4.2. Linearidade de resposta do detector e limite de detecção e quantificação do aparelho

A quantificação dos quatro agrotóxicos foi realizada pelo método da padronização interna. Este método consiste na preparação das soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade conhecida de um composto chamado padrão interno, onde se relaciona a concentração dos analitos com a razão das áreas (área do pico do analito / área do pico padrão interno). Pequenas variações na

temperatura da coluna, no volume da amostra ou possíveis erros nas injeções podem ser minimizados com o uso do padrão interno (RIBANI *et al.*, 2004).

O padrão interno escolhido para este estudo foi a bifentrina pertencente ao grupo químico dos piretróides. Esta substância não é degradada durante o processo, possui tempo de retenção diferente dos compostos analisados, não reage com os componentes da matriz, e é submetida às mesmas condições de análise das substâncias de interesse durante a corrida cromatográfica.

Verificou-se que para as soluções padrão preparada em acetonitrila na faixa de concentração entre 5 a 750  $\mu\text{g L}^{-1}$  a resposta do detector foi linear com coeficientes de correlação superiores a 0,99, para os quatro agrotóxicos. Estes resultados estão representados na Figura 1.12.



**Figura 1.12** – Correlação entre as respostas do detector e as concentrações das soluções de clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina em acetonitrila.

Injetando solução padrão dos mesmos agrotóxicos em acetonitrila em concentração menores que  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$  foi encontrado o limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do aparelho. O LD foi considerado como a concentração que gerou uma resposta pelo menos 3 vezes o ruído e o LQ

considerando a concentração que gerou uma resposta pelo menos 10 vezes o desvio padrão do ruído. Os LD e LQ para o equipamento quando se utilizou o método da relação sinal-ruído foi 0,1 e 0,33  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o clorpirifós; 5,0 e 16,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o tiametoxam, 1,0 e 3,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a cipermetrina e 2,5 e 8,25  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a deltametrina, respectivamente.

Pode-se observar pela sensibilidade analítica (Figura 1.12) das curvas analíticas que o detector por captura de elétrons (DCE) é mais sensível ao clorpirifós e menos sensível ao tiametoxam. Esta sensibilidade está relacionada com a presença e a quantidade de átomos eletronegativos que capturam elétrons. O clorpirifós, cipermetrina e tiametoxam apresentam respectivamente em suas estruturas 3, 2 e 1 átomos de cloro, já a deltametrina apresenta 2 átomos de bromo.

Analisando-se as equações das curvas obtidas para ELL-PIS e análise por CG-DCE (Figura 1.12) pode-se deduzir que os modelos lineares são bastante adequados. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007), sendo assim os valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos da regressão linear dos dados experimentais estão de acordo com as normas estabelecidas por estes órgãos na faixa de concentração trabalhada para os agrotóxicos em estudo.

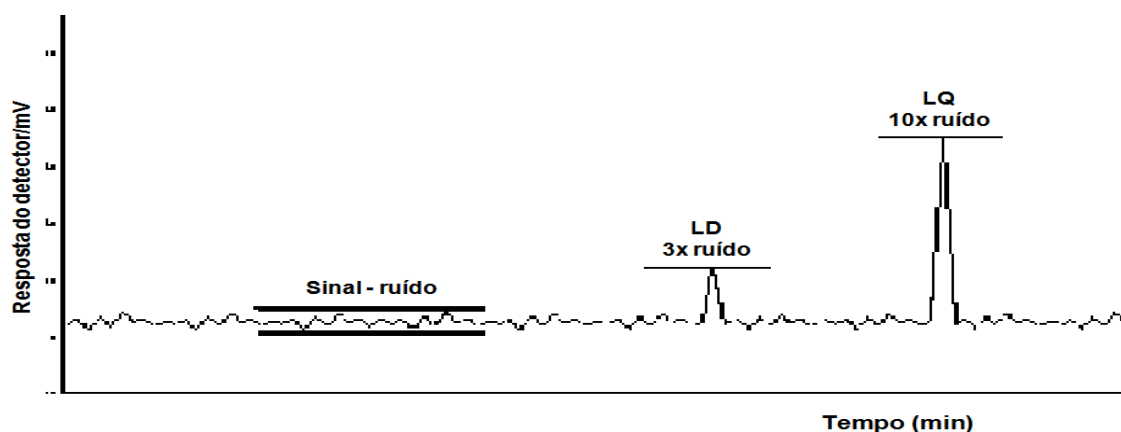
#### **1.4.4.3. Limite de detecção e limite de quantificação do método ELL- PIS**

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, como por exemplo, a análise de resíduos, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectada pelo método. O limite de detecção (LD) é a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, já o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas (INMETRO, 2007; ANVISA, 2003).

Há três formas de estimar os limites de detecção e de quantificação, e a escolha de uma delas deve levar em consideração a técnica analítica utilizada

e o grau de confiabilidade estatística necessária: método visual, método da relação sinal-ruído, e método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

Neste estudo os limites de detecção e quantificação do método foram determinadas pelo método da relação sinal-ruído (INMETRO, 2007; RIBANI *et al.*, 2007). Para determinar o LD foi considerada a concentração cujo sinal analítico apresentado foi  $\geq 3$  vezes a altura do nível de ruído da linha de base obtido para amostras de água isentas de agrotóxicos (branco), no tempo de retenção dos picos de interesse e 10 vezes maior que a altura do sinal do ruído para o LQ. Os valores de LD e LQ teóricos foram estabelecidos com base na Figura 1.13 utilizando, respectivamente, a relação 3:1 e 10:1 para o LD e LQ.



**Figura 1.13** - Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de LD e LQ. Fonte: Adaptado de (GONÇALVES, 2007)

Após a injeção dos extratos no CG-DCE foram construídas curvas analíticas para os quatro agrotóxicos estudados nos valores de concentrações apresentados no item 1.3.8.3. Os valores do tempo de retenção dos compostos, equação da reta, coeficiente de determinação ( $r^2$ ), faixa de trabalho, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para o método desenvolvido para análise de agrotóxicos em água, empregando a técnica de extração líquido-líquido e partição induzida por sal e análise por CG-DCE estão representados na Tabela 1.7.

**Tabela 1.7** - Valores do tempo de retenção, equação da reta, coeficiente de correlação, faixa de trabalho, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método.

Agrotóxicos	T <sub>R</sub> (min)	Equação da reta ( $y = ax + b$ )	r <sup>2</sup>	Faixa de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Clorpirifós	5,7	$y = 0,087x - 0,033$	0,994	0,5 – 6,0	0,15	0,50
Tiametoxam	5,9	$y = 0,005x + 0,360$	0,990	18 - 450	5,50	18,20
Cipermetrina	10,9	$y = 0,024x + 0,813$	0,992	5,0 - 60	1,50	5,0
Deltametrina	13,2	$y = 0,005x + 0,155$	0,993	12 -150	3,70	12,0

Levando-se em consideração o limite de quantificação (LQ) do aparelho para cada analito estudado, a razão entre o volume de extrato obtido (5,0 mL) e o volume de amostra utilizada no método em desenvolvimento (3,0 mL) e as porcentagens de recuperação de cada composto, obtêm-se valores próximos às concentrações mínimas a serem detectadas, mas não quantificada pelo CG-DCE nos extratos de água e quando este valor é multiplicado por 10 estimamos o limite superior da faixa de trabalho. Deste modo foi estabelecida a faixa de trabalho a ser estudada, de modo que no primeiro ponto da curva analítica foi incluído o LQ do método para cada substância em estudo.

Levando-se em conta o volume de amostra de água (3,0 mL) utilizada durante todo o processo de extração, os limites de detecção para os quatro agrotóxicos variaram de 0,15 a 5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , já os limites de quantificação variaram de 0,5 a 18,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ , onde o clorpirifós apresentou menor LD e LQ do método, em contrapartida o tiametoxam apresentou um maior limite, demonstrando ser menos sensível.

Resultados semelhantes foram obtidos por VIEIRA *et al.*, (2007) ao analisar piretróides em amostras de água, utilizando a técnica extração líquido-líquido com partição por baixa temperatura (ELL- PBT) e análise por CG-DCE. Neste estudo, o limite de detecção e quantificação estabelecido para a cipermetrina foi de 1,9 e 2,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  e para a deltametrina foi de 2,9 e 5,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

BITTENCOURT (2008) ao analisar o agrotóxico tiametoxam em amostras de solo utilizando a técnica de ELL-PBT, obteve LD igual a 3,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  e LQ 10,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , já PUSSENTE (2008) obteve LD e LQ igual a 5,0 e 15,0

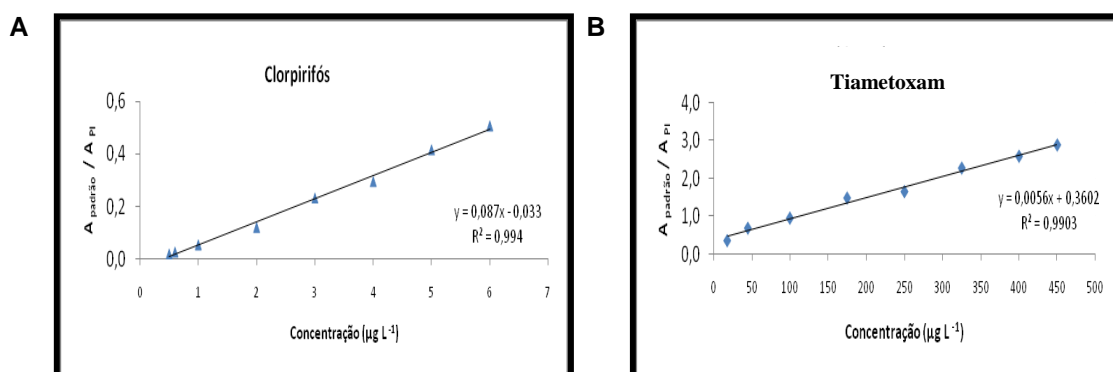
$\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente quando analisou este composto em amostras de maçã. Segundo Sanino (2004) a classe dos neonicotinóides apresenta uma maior sensibilidade quando são analisados por cromatografia líquida.

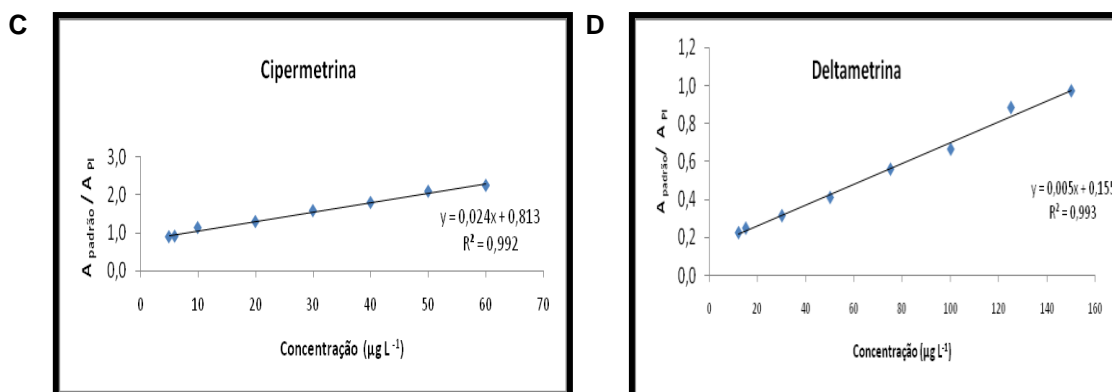
Usando a técnica microextração líquido-líquido ao analisar o agrotóxico clorpirifós em amostras de água, MENEGHINI (2006) obteve LD igual a 0,4 e LQ  $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$  para o método.

Em relação aos quatro agrotóxicos analisados neste estudo, a atual legislação brasileira de potabilidade de água, não apresenta valor máximo permitido (VMP) para nenhum destes princípios ativos. O único piretróide regulamentado pelo Ministério da Saúde (Portaria nº 518 de 25 de março de 2004) é a permetrina, cujo VMP é  $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . Utilizando este valor como padrão para todos piretróides, podemos concluir que os LD e LQ do método para cipermetrina e deltametrina estão abaixo deste limite.

A concentração máxima permitida de clorpirifós em água potável é  $90,0 \mu\text{g L}^{-1}$  (HEALTH CANADA, 2008), sendo que o LD e LQ obtidos pelo método para este composto está bem abaixo do exigido pela legislação do Canadá. O VMP para o tiametoxam em amostras de água não foi evidenciado nas legislações internacionais. Os resultados obtidos neste trabalho foram similares a outros descritos na literatura e considerados satisfatórios para detecção de resíduos de agrotóxicos em matrizes aquosas.

Observando os resultados da Tabela 1.7 e Figuras 1.14 (A, B, C, D) nota-se que todas as curvas analíticas apresentaram boa linearidade do método na faixa de concentração estudada, pois apresentaram coeficientes de determinação ( $r^2$ ) superiores a 0,99 para os quatro compostos analisados.





**Figura 1.14** - Curvas analíticas dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina obtidos da aplicação da técnica ELL-PIS em amostras de água e análise por CG-DCE.

#### 1.4.4.4. Precisão

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (INMETRO, 2007). É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e precisão intermediária.

##### 1.4.4.4.1. Repetitividade

É o grau de concordância entre os resultados de medições, sob as chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento de medição; mesmo observador; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; e repetições dentro de um curto período de tempo (INMETRO, 2007).

A repetitividade foi avaliada pelo cálculo da estimativa do coeficiente de variação (CV) de sete repetições do procedimento otimizado da extração líquido-líquido com partição induzida por sal para os agrotóxicos clorpirifós ( $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), tiametoxam ( $110,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), cipermetrina ( $30,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e deltametrina ( $72,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) utilizando concentrações iguais a 6 vezes o LQ do método. As

porcentagens de recuperação obtidas (%R) e os coeficientes de variação (CV) estão apresentados na Tabela 1.8.

**Tabela 1.8** - Porcentagens de recuperação (%R), coeficientes de variação, CV (%) obtidos após sete extrações em amostras de água dos agrotóxicos clorpirifós ( $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), tiametoxam ( $110,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), cipermetrina ( $30,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e deltametrina ( $72,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

Recuperação (%) (média $\pm$ CV)			
Clorpirifós	Tiametoxam	Cipermetrina	Deltametrina
83,6 $\pm$ 6,8	76,9 $\pm$ 8,1	88,5 $\pm$ 5,7	87,7 $\pm$ 5,4

Os coeficientes de variação obtidos para amostras de água variaram entre 5,4 % a 8,1%, onde o tiametoxam apresentou maior dispersão dos resultados. Desta forma, podemos concluir que o método estudado apresentou boa precisão, em termos de repetitividade, uma vez que os coeficiente de variação apresentam valores bem menores que os aceitáveis para matrizes simples que podem ser até de 15% (RIBANI *et al.*, 2004).

#### 1.4.4.4.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária, também denominada de reprodutibilidade interna, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes tempos (INMETRO, 2007).

Neste trabalho optou-se por avaliar a precisão intermediária do método, variando-se o tempo, ou seja, determinou-se a variação na porcentagem de recuperação de clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina em água, por ELL-PIS, após uma semana e um mês, da realização do primeiro teste, todos feitos pelo mesmo analista nas mesmas condições. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 1.9.

**Tabela 1.9** - Porcentagens de recuperação, (%R), e coeficientes de variação, CV (%), obtidos da aplicação do método ELL-PIS, com sete repetições, em amostras de água fortificadas com os quatro agrotóxicos, em diferentes dias, pelo mesmo analista.

	Recuperação (%) (média ± CV)			
	Clorpirifós	Tiametoxam	Cipermetrina	Deltametrina
1 dia	83,1± 6,4	77,9 ± 7,9	87,4± 6,2	86,7± 6,2
1 semana	82,2 ± 6,9	76,7± 8,1	90,1± 7,0	91,4 ±4,8
1 mês	83,1± 5,7	77,9± 8,7	89,9± 6,7	85,9± 4,9

Os estudos evidenciaram que a técnica de extração e análise de agrotóxicos em água apresenta porcentagens de recuperação estatisticamente iguais, ao nível de 95% de probabilidade pelo teste t, quando é realizada no mesmo laboratório, pelo mesmo analista e em dias diferentes. É possível concluir que o método proposto apresenta boa precisão intermediária, e os coeficientes de variação (%CV) obtidos apresentam valores inferiores a 8,7%.

#### 1.4.4.5. Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH,1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2007). Os processos utilizados para avaliar a exatidão do método ELL-PIS foram o ensaio de recuperação e a comparação de métodos.

##### 1.4.4.5.1. Ensaios de recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação, onde a recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007). Estes órgãos citados acima estabelecem que os ensaios de recuperação devem ser determinados utilizando-se, no mínimo, três níveis de concentração (baixa, média e alta), contemplando a faixa de linearidade do método.

Neste trabalho, as porcentagens de recuperação foram calculadas segundo recomendações da ANVISA (2003) e INMETRO (2007), de modo que as substâncias de interesse foram adicionadas à matriz água em concentrações próximas a 1, 3, 6 e 12 vezes o limite de quantificação do método (item 1.3.8.5.1).

Assim, os ensaios de recuperação das amostras fortificadas conforme descrito no item 1.3.8.5.1 foram realizados extraíndo as substâncias de interesse, presente na matriz, conforme o procedimento otimizado, obtendo-se no extrato final 0,5, 1,5, 3,0 e 6,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o princípio ativo clorpirifós; 18,2; 55,0; 110,0 e 220,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o tiametoxam; 5,0; 15,0; 30,0 e 60,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a cipermetrina e 12,0, 36,0, 72,0 e 144,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a deltametrina. A porcentagem de recuperação (%R) com seus respectivos coeficientes de variação para cada agrotóxico estão apresentados na Tabela 1.10.

**Tabela 1.10** - Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação (%CV) obtidos após as extrações das amostras de água fortificadas com os agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina em quatro diferentes concentrações.

Agrotóxicos	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação (%) (média $\pm$ CV)
Clorpirifós	0,5	81,3 $\pm$ 8,9
	1,5	79,7 $\pm$ 8,6
	3,0	83,1 $\pm$ 6,4
	6,0	81,4 $\pm$ 5,8
Tiametoxam	18,0	72,2 $\pm$ 8,3
	55,0	74,8 $\pm$ 9,6
	110,0	77,9 $\pm$ 7,9
	220,0	74,1 $\pm$ 3,7
Cipermetrina	5,0	87,8 $\pm$ 7,1
	15,0	89,6 $\pm$ 7,5
	30,0	87,4 $\pm$ 6,2
	60,0	88,8 $\pm$ 5,1
Deltametrina	12,0	87,8 $\pm$ 7,1
	36,0	88,1 $\pm$ 7,7
	72,0	86,7 $\pm$ 6,2
	144,0	90,1 $\pm$ 4,9

O presente estudo obteve porcentagens de recuperação para os quatro agrotóxicos variando entre 72,2 a 90,1% e os intervalos de coeficientes de variação encontrados foram de 3,7 a 8,9 %.

Os resultados apresentados na Tabela 1.10 para extração dos quatro agrotóxicos em amostras de água são estatisticamente equivalentes entre si, mostrando que a recuperação independe do nível de concentração dos analitos na amostra. Os valores dos desvios-padrão obtidos para os níveis de concentração (1, 3 e 6 X LQ do método) apresentaram-se similares para ambos compostos, entretanto quando se utilizou uma concentração igual a 12X LQ do método ocorreu menor dispersão dos resultados.

#### 1.4.4.5.2. Comparação de métodos

Este estudo consistiu na comparação dos resultados obtidos empregando-se a metodologia extração líquido-líquido e partição induzida por sal (ELL-PIS) para os agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina em amostras de água fortificadas (item 3.5.4.1), com dois métodos utilizados como referência. O método 1 (VIEIRA, 2007) utiliza extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT), enquanto o método 2 (VIÑAS, 2002) consiste de uma extração líquido-líquido tradicional, conforme descrito no (item 1.3.8.5.2). Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 1.11.

**Tabela 1.11** - Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação (%CV) obtidos de extrações em amostras de água dos agrotóxicos clorpirifós ( $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), tiametoxam ( $110,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), cipermetrina ( $30,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e deltametrina ( $72,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) usando ELL-PIS e dois métodos de referência

	Recuperação (%) (média $\pm$ CV)		
	Método 1	Método 2	ELL-PIS
Clorpirifós	79,9 $\pm$ 4,7	83,3 $\pm$ 9,3	85,6 $\pm$ 6,3
Tiametoxam	75,5 $\pm$ 8,6	79,1 $\pm$ 6,1	76,6 $\pm$ 7,5
Cipermetrina	87,3 $\pm$ 6,2	75,4 $\pm$ 4,8	90,5 $\pm$ 6,3
Deltametrina	82,7 $\pm$ 4,9	82,5 $\pm$ 5,7	88,6 $\pm$ 6,3

Considerando-se o grau de proximidade entre os resultados obtidos

pelo método ELL-PIS e os métodos 1 e 2, pode-se concluir que ambas metodologias não apresentaram grandes dispersões do coeficiente de variação e as porcentagens de recuperação obtidas para clorpirifós, tiametoxam, e deltametrina foram estatisticamente iguais (ao nível de 95% de probabilidade) nos três métodos estudados, com exceção da cipermetrina que apresentou maior eficiência de extração no método ELL-PIS (90,2 %) quando comparado ao método 2 (75,4 %).

Quando comparamos o método 1 com ELL-PIS podemos constatar que ambos são eficientes, utilizam pequeno volume de amostra e solventes. A ELL-PSI requer menor tempo para separação das fases (apenas alguns minutos) enquanto que o método 2 necessita de 12 h para formação de um sistema bifásico. Apesar desta vantagem oferecida pelo método ELL-PIS, este apresenta o inconveniente de ter que evaporar a amostra, pois são formados aproximadamente 5,3 mL de extratos e estes são recuperados em balão volumétrico de 5,0 mL.

O método 2 apresenta como vantagem a pré-concentração das amostras de água, aproximadamente igual a 3 vezes, entretanto é importante ressaltar que durante este processo impurezas da matriz são concentradas junto com o analito. Apesar dos cromatogramas se mostrarem com qualidade inferior, não foi observado nenhum interferente no tempo de retenção dos compostos de interesse. Além disso, no método 2 são requeridos um volume relativamente grande de amostras (25,0 mL) e de solventes (135,0 mL), gerando maiores problemas de contaminação ambiental e riscos à saúde do analista, enquanto que no método ELL-PIS, pequena quantidade de amostra (3,0 mL) e solvente (6,0 mL) são necessárias para as determinações.

#### **1.4.5. Análise de amostras de águas superficiais e avaliação do efeito de matriz**

A metodologia de extração líquido-líquido com partição induzida por sal (efeito *salting out*) proposta neste trabalho foi aplicada em amostras de águas coletadas em rios da Zona da Mata Mineira, nos municípios de Manhuaçu, Matipó, Raul Soares, em um córrego em São José do Goiabal e em água de torneira. As amostras foram coletadas em diferentes pontos dos rios e córregos e

determinados os seguintes parâmetros no momento da coleta: pH, temperatura da água e do ambiente. O pH variou entre 5,0 a 6,5, a variação da temperatura da água foi de 17 a 21 °C e a temperatura ambiente manteve-se entre 21 a 25 °C. As análises foram realizadas em triplicatas.

Não foi constatada a presença de resíduos de nenhum dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina nas amostras de água coletadas nos rios e córregos da Zona da Mata Mineira e nem na água de torneira ou se encontravam em concentrações inferiores ao limite de detecção do método. A meia-vida, principalmente dos piretróides é relativamente curta, deste modo, uma forma de aumentar a probabilidade de detectar contaminação nos recursos hídricos seria coletar as amostras no período em que a aplicação de agrotóxicos coincidissem com o período de chuvas mais intensas na região da coleta, pois nos períodos chuvosos, espera-se um aumento das pragas com um conseqüente aumento da aplicação de agrotóxicos.

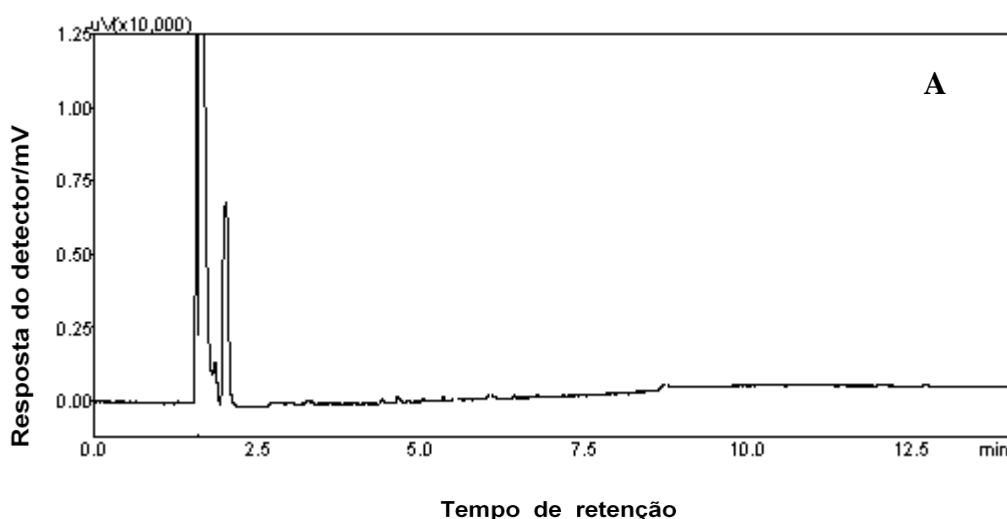
Após a obtenção dos resultados da análise da água coletadas nos rios da Zona da Mata Mineira e constatado a isenção dos agrotóxicos em estudo, três amostras de água dos rios que apresentavam um aspecto mais turvo em razão do material particulado, foram contaminadas com quantidades conhecidas dos quatro agrotóxicos, como descrito no item 1.3.9.

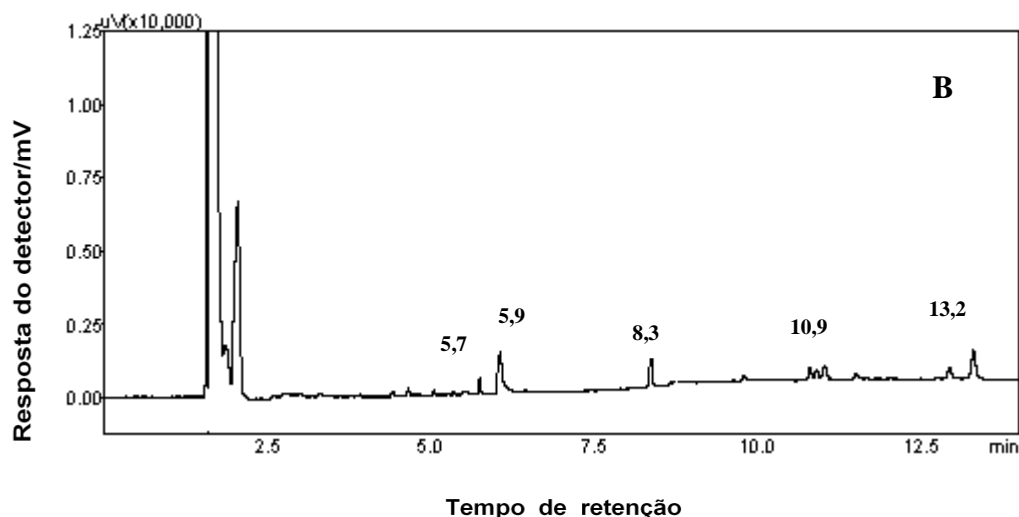
Posteriormente, sem nenhum tratamento prévio, estas amostras naturais foram submetidas ao procedimento de extração otimizado e validado conforme descrito no item 1.4.4 a fim de avaliar o efeito de matriz e a seletividade do mesmo. A Tabela 1.12 mostra os resultados obtidos para as porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação (CV), após extrações dos quatro agrotóxicos nas diferentes matrizes de água fortificadas.

**Tabela 1.12** – Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação, CV (%), obtidos de extrações de agrotóxicos em amostras de água destilada e de águas de rios da Zona da Mata mineira fortificada com os princípios ativos clorpirifós ( $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), tiametoxam ( $110,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), cipermetrina ( $30,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e deltametrina ( $72,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

	Recuperação (%) (média $\pm$ CV)			
	Clorpirifós	Tiametoxam	Cipermetrina	Deltametrina
Água destilada	83,1 $\pm$ 6,8	75,6 $\pm$ 7,1	89,7 $\pm$ 7,0	85,3 $\pm$ 5,9
Amostra 1	81,2 $\pm$ 5,9	76,5 $\pm$ 8,8	91,1 $\pm$ 7,5	90,2 $\pm$ 6,2
Amostra 2	82,4 $\pm$ 6,1	77,9 $\pm$ 9,1	88,9 $\pm$ 6,7	87,9 $\pm$ 5,1
Amostra 3	84,6 $\pm$ 5,7	75,9 $\pm$ 8,1	87,5 $\pm$ 5,3	86,7 $\pm$ 6,4

Os resultados permitiram indicar que as porcentagens de recuperação dos agrotóxicos nas amostras 1, 2 e 3 são semelhantes aos resultados obtidos em água destilada, demonstrando que não existe efeito de matriz na análise, comprovando a eficiência do método de ELL-PIS. Na figura 1.15 estão representados os cromatogramas dos extratos obtidos da amostra de água superficial e da amostra após fortificação das mesmas com os agrotóxicos clorpirifós ( $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), tiametoxam ( $110,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), cipermetrina ( $30,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e deltametrina ( $72,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ).





**Figura 1.15** - A) cromatograma do extrato obtido da matriz água do Rio Matipó, B) Cromatograma da amostra de água do Rio Matipó fortificada com os princípios ativos clorpirifós ( $t_R = 5,7$  min), tiametoxam ( $t_R = 5,9$  min), padrão interno ( $t_R = 8,3$  min), cipermetrina ( $t_R = 10,9$  min) e deltametrina ( $t_R = 13,2$  min).


#### 1.4.6. Método otimizado e validado para extração de agrotóxicos em água

O método de Extração Líquido-Líquido com Partição Induzida por Sal (ELL-PIS) foi otimizado e validado para análise simultânea dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina em amostras de água.

A técnica para extração dos agrotóxicos em estudo consiste em utilizar 3,0 mL de amostra de água juntamente com 6,0 mL de mistura extratora (5,0 mL de acetonitrila e 1,0 mL de acetato de etila), formando uma fase única. Com a finalidade de separar as fases, é adicionado à mistura 1,0 mL de solução de NaCl 2,0 mol L<sup>-1</sup> (efeito *salting out*). A mistura é homogenizada em vórtex por 40 segundos e deixada em repouso (cerca de um minuto) formando um sistema bifásico. A fase orgânica superior contendo os agrotóxicos de interesse é retirada com pipeta automática e aferida em um balão volumétrico de 5,0 mL contendo padrão interno (bifentrina). Os extratos são armazenados em freezer á - 20 °C para posterior análise por cromatografia gasosa.

ELL-PIS demonstrou ser um método simples, rápido, com boa eficiência de extração e frequência analítica, curto tempo para separação das fases, pequena quantidade de amostra é necessária para as determinações (3,0 mL) requerendo menor consumo de solventes orgânicos .

**CAPÍTULO 2 - Análise de resíduos de agrotóxicos em águas de lavagem de frutas e hortaliças e nos frutos *in natura***



## 2.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1.1. Monitoramento de alimentos

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), frutas e vegetais são responsáveis por uma média de 30% do consumo alimentar por massa de indivíduos, e são o grupo de alimentos mais consumidos (WHO, 2003). A ingestão de ingredientes ativos através da ingestão de alimentos tem mostrado ser de até cinco ordens de magnitude maior do que outras vias de exposição, como a inalação de ar e ingestão de água potável (HUMBERT *et al.*, 2007; JURASKE *et al.*, 2007).

No Brasil, estabelecer limites máximos de resíduos (LMR's) é competência do Ministério da Saúde. No caso de não estarem estabelecidos pela ANVISA, utilizam-se os internalizados no MERCOSUL, os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, os constantes nas Directivas da União Européia e os utilizados pelo Foods and Drugs Administration (FDA) (BRASIL, 1999).

Limite máximo de resíduos (LMR) é um conceito de caráter toxicológico estabelecido na legislação, definido como sendo a quantidade máxima de resíduos de agrotóxico legalmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até seu consumo, expressa em partes do agrotóxico por um milhão de partes de alimento (em peso) – ppm ou mg kg<sup>-1</sup> (GORENSTEIN, 2004).

Cada produto químico tem um período de carência (o intervalo de tempo, em dias, que deve ser observado entre a aplicação do agrotóxico e a colheita do produto agrícola) específico. E quando a colheita acontece antes do prazo, corre-se o risco de consumir alimentos com resíduos (UMBELINO, 2009). A dificuldade em controlar os efeitos provocados pelo uso de agrotóxicos em alimentos está no fato de que essa é uma contaminação invisível. “É praticamente impossível para o consumidor reconhecer um produto que recebeu a pulverização de produtos não permitidos ou além do limite

autorizado, por isso é tão importante termos um programa que faça esse controle” (ANVISA, 2006).

O objetivo do PARA (Programa de análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos), criado em 2001, é manter a segurança alimentar do consumidor e a saúde do trabalhador rural. O Programa, coordenado pela ANVISA em conjunto com os órgãos de Vigilância Sanitária Estaduais e Municipais, abrange, atualmente, 25 estados e o Distrito Federal. O PARA monitorou de 2002 a 2007 os níveis de agrotóxicos presentes em nove tipos de alimentos consumidos *in natura*: alface, banana, batata, cenoura, laranja, maçã, mamão, morango e tomate. No ano de 2008, o PARA acompanhou oito novas culturas, até então nunca monitoradas: abacaxi, arroz, cebola, feijão, manga, pimentão, repolho e uva (PARA, 2009).

Na Tabela 2.1 estão os resultados insatisfatórios entre 2002 e 2008 obtidos para frutas e hortaliças utilizadas neste trabalho e monitoradas pelo PARA. Os resultados insatisfatórios referem-se àquelas amostras que apresentaram ingredientes ativos de agrotóxicos acima do Limite Máximo de Resíduos (LMR) permitido ou resíduos de agrotóxicos não autorizados para uma determinada cultura.

**Tabela 2.1** - Porcentagens de amostras contaminadas por agrotóxicos no período de 2002 a 2008

Resultados insatisfatórios (%)							
Cultura	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Maçã	4,04	3,67	4,96	3,07	5,33	2,9	3,92
Morango	46,03	54,55	39,07	N	37,68	43,62	36,05
Tomate	26,1	0	7,36	4,38	2,01	44,72	18,27
Pimentão	N	N	N	N	N	N	64,36

N = Análises não realizadas.

Fonte: (ANVISA, 2009)

Na Tabela 2.2 estão os resultados considerados pelo PARA como insatisfatórios do ano de 2008 para as culturas (maçã, morango, tomate e pimentão) com os respectivos ingredientes ativos encontrados acima do Limite Máximo de Resíduos (> LMR) permitido ou resíduos de agrotóxicos Não Autorizados (NA) para uma determinada cultura.

**Tabela 2.2** - Dados consolidados do PARA 2008 para as culturas (maçã, morango, tomate e pimentão).

Cultura	Total de amostras analisadas	Amostras insatisfatórias		Ingredientes ativos encontrados nas amostras insatisfatórias
		Nº Insatisfatório	% Insatisfatório	
Maçã	102	4	3,92	<b>NA:</b> Diclorvós, Triazofós > <b>LMR:</b> Metidationa
Morango	86	31	36,05	<b>NA:</b> Acefato, Captana, Clorfenapir, Clorotalonil, Clorpirifós, Deltametrina, Endossulfam, Folpete, Metamidofós, Procloraz, Tetradifona, > <b>LMR:</b> Ditiocarbamatos, Fempropatrina, Tebuconazol.
Tomate	104	19	18,27	<b>NA:</b> Aldicarbe, Aletrina, Ciproconazol, Clorpirifós, Clorpirifós-metílico, Folpete, Metamidofós > <b>LMR:</b> Fentoato, Permetrina
Pimentão	101	65	64,36	<b>NA:</b> Bifentrina, Bromopropilato, Carbendazim, Cipermetrina, Clorpirifós, Dicofol, Endossulfam, Esfenvalerato, Fempropatrina, Fenarimol, Lambdacialotrina, Metamidofós, Permetrina, Procimidona, Procloraz, Profenofós, Tebuconazol, Triazofós > <b>LMR:</b> Acefato, Clorotalonil, Deltametrina, Difenconazol

Fonte : (ANVISA, 2009)

Na cultura da maçã, seguindo a tendência dos anos anteriores, os resultados do PARA (2008) indicaram, em 102 amostras analisadas, uma porcentagem de irregularidades de 3,92% (4 amostras). Estes resultados podem ser explicados pelo fato da produção da maçã estar inserida em uma cadeia produtiva organizada, voltada essencialmente para a exportação, na qual as Boas Práticas Agrícolas são, em geral, adotadas.

No ano de 2008, foram analisadas 86 amostras de morango, sendo que 36,05% (31 amostras) foram consideradas insatisfatórias. Nas 31 amostras irregulares, foram constatadas 49 ocorrências de resíduos, ou seja, algumas amostras apresentaram resíduos de mais de um ingrediente ativo. Pelos resultados encontrados é possível observar que a utilização de agrotóxicos na cultura do morango é muito intensa, com ampla utilização de ingredientes ativos não autorizados (UMBELINO, 2009).

Foram analisadas 104 amostras de tomate. Os resultados demonstraram que 18,27% (19) destas amostras estavam insatisfatórias, tanto pela presença de resíduos de agrotóxicos acima do LMR, quanto pela presença de resíduos de agrotóxicos não autorizados para esta cultura. Destaca-se a detecção de resíduos de aldicarbe, um ingrediente ativo que, além de não ser autorizado para o tomate, tem sua venda restrita a apenas três Estados da Federação (Bahia, Minas Gerais e São Paulo), para produtores cadastrados no programa de venda da única empresa fabricante do produto formulado a base deste ingrediente ativo (ANVISA, 2009).

No primeiro ano de monitoramento, o pimentão foi o alimento que apresentou o maior índice de irregularidades para resíduos de agrotóxicos durante o ano de 2008. Das 101 amostras de pimentão analisadas, 64,36% apresentaram irregularidades (65 amostras). Nestas, foram identificados 22 ingredientes ativos, dos quais 18 não estão autorizados para a cultura e 4 estavam acima do LMR estabelecido pela legislação. Também é preocupante a detecção de resíduos de dicofol, uma vez que esse agrotóxico é do grupo químico dos organoclorados, possui classe toxicológica II (altamente tóxico) e tem seu uso restrito em muitos países por impactar gravemente o meio ambiente e oferecer altos riscos à saúde humana. No Brasil, tem seu uso autorizado apenas para as culturas do algodão, citros e maçã (ANVISA, 2009).

Em vista das irregularidades expostas pelo Programa de análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA), surgiu um grande interesse em monitorar a qualidade de frutas e hortaliças comercializadas em Viçosa, MG.

### **2.1.2. Lavar os alimentos retira-se os agrotóxicos?**

Alguns estudos mostram que uma lavagem adequada dos alimentos em água da torneira pode reduzir a contaminação destes (KROL *et al.*, 2000;

JURASKE *et al.*, 2007; JURASKE *et al.*, 2008).

Segundo Juraske *et al.* (2007), técnicas comuns de processamento de alimentos, como lavar, descascar ou cozimento pode reduzir substancialmente os resíduos de agrotóxicos. Em um dos seus experimentos para determinar a quantidade de pesticidas removidos a partir do fruto devido ao processamento da lavagem, frutos de tomate foram lavados com água fria (21 ° C) e quente (47 ° C). A água utilizada para lavar em todas as etapas de processamento foi água da torneira sem detergentes. Concentrações de Captan em tomates foram reduzidos em 69% quando lavados em água fria (21 ° C) e por 78% com água quente da torneira (47 ° C). Da mesma forma, em um estudo realizado por Rawn *et al.* 2008, resíduos de Captan em maçãs lavadas por 10-15 segundos, com suave movimentação das mãos sobre o fruto, foram 50% menores do que naqueles que receberam maçãs sem lavagem pós-colheita.

Christensen *et al.* (2003) estudaram a influência das etapas de processamento, como lavagem e cozimento, em resíduos de três fungicidas (tolifluanida, fenhexamida e pirimetanil) aplicados em morangos, em condição de campo. A lavagem reduziu, em média, 37% de tolifluanida, 34% de fenhexamida e 19% de pirimetanil. Para tolifluanida e fenhexamida, a alta concentração inicial afetou significativamente essa redução. Na produção de geléia houve redução significativa de tolifluanida, em média 91%. Para o fenhexamida e pirimetanil, foram observadas reduções de 25% e 33%, respectivamente.

Clorpirifós e seu produto de degradação 3,5,6-tricloro-2-piridinol foram recuperados a partir de grãos de arroz fortificadas nos níveis de 456,0 e 3,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. A lavagem dos grãos de arroz com a água removeu cerca de 60% dos resíduos de clorpirifós (LEE *et al.*, 1991). O nível de resíduo inicial Diazinon (0,822 mg kg) em pepino foi reduzida em 22,3% por lavagem em água corrente por 15 segundos (CENGIZ *et al.*, 2006), já o nível de resíduo inicial de procimidona (0,86 mg kg<sup>-1</sup>) em tomates diminuiu 68% utilizando o mesmo processo (CENGIZ *et al.*, 2007). Lavagem de grão de bico reduziu os resíduos de deltametrina por 15,69% a partir de um nível inicial de 0,051 mg kg<sup>-1</sup> (LAL & DIKSHIT, 2001).

Krol *et al.* (2000) estudaram o efeito da lavagem com água corrente na redução de 20 pesticidas em produtos como morango, alface, espinafre, pêra,

framboesa, beterraba, tomate, pêsego, ervilha, cenoura, pepino, maçã, aspargo e nectarina. As amostras foram obtidas em supermercados e em experimento no campo. Reduções significativas em níveis de resíduos dos pesticidas endossulfon, permetrina, diazinon, DDE, metoxicloro, malation, captana, iprodione, clorotalonil foram obtidos através do simples ato de lavagem em água da torneira. Inversamente, não foi observado redução nos resíduos de pesticidas clorpirifos, bifentrina, ou vinclozolina após a lavagem em água da torneira.

A solubilidade em água (em  $\text{mg/L}^{-1}$  a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para a maioria dos compostos analisados por Krol *et al.* (2000) é relativamente baixa, exceto para o malation. Metoxicloro e a bifentrina têm a mesma solubilidade em água ( $0,1\text{ mg/L}^{-1}$ ), ainda assim o metoxicloro é removido com a lavagem, e a bifentrina não. Por último, clorpirifós é mais solúvel em água que o endosulfan e permetrina, e ainda assim as quantidades no fruto não é reduzida com o processo de lavagem. Este estudo confirma que a hidrossolubilidade de agrotóxicos não desempenha um papel significativo na redução de resíduos destes compostos.

Quanto à penetração dos produtos, Franco (2004) cita três categorias de resíduos: resíduos extracuticulares, aderentes à camada de cera da cutícula; resíduos cuticulares, que estão incrustados ou dissolvidos na camada de cera; e resíduos subcuticulares, penetrados abaixo dela. Os depósitos podem ser facilmente removidos por lavagens. Já os resíduos cuticulares podem ser removidos por lavagem e raspagem. Resíduos subcuticulares não podem ser eliminados ou mesmo diminuídos por meios mecânicos, exceto em poucos casos como descascando o fruto, onde a maior parte da penetração é restrita à casca.

Em sua Nota Técnica de esclarecimento sobre o risco de consumo de frutas e hortaliças cultivadas com agrotóxicos, a ANVISA relata que estes compostos podem ser divididos quanto ao modo de ação entre sistêmicos e de contato. Os agrotóxicos sistêmicos são aqueles que, quando aplicados nas plantas, circulam através da seiva por todos os tecidos vegetais, de forma a se distribuir uniformemente e ampliar o seu tempo de ação. Os de contato são aqueles que agem externamente no vegetal, tendo necessariamente que entrar em contato com o alvo biológico. E mesmo estes são também, em boa parte,

absorvidos pela planta, penetrando em seu interior através de suas porosidades (ANVISA, 2009).

A lavagem dos alimentos em água corrente só remove parte dos resíduos de agrotóxicos presentes na superfície dos mesmos. Os agrotóxicos sistêmicos e uma parte dos de contato, por terem sido absorvidos por tecidos internos da planta, caso ainda não tenham sido degradados pelo próprio metabolismo do vegetal, permanecerão nos alimentos mesmo que esses sejam lavados. Neste caso, uma vez contaminados com resíduos de agrotóxicos, estes alimentos levarão o consumidor a ingerir resíduos de agrotóxicos (ANVISA, 2009).

Nessa avaliação deve-se considerar que os resíduos remanescentes nos alimentos dependem de muitos fatores como grau de adsorção nas camadas superficiais, degradação química ou metabolismo, desaparecimento aparente devido à diluição pelo crescimento da planta, volatilidade do depósito e tipo de aplicação (MACIEL, 2005).

Em virtude do alto consumo de frutas e hortaliças *in natura* ingeridas pela população em geral, esta etapa do trabalho foi conduzida com o objetivo de examinar a água de lavagem de maçãs, morangos, pimentões e tomates quanto à presença de resíduos dos agrotóxicos: clorpirifós, tiametoxam, bifentrina, cipermetrina e deltametrina. As frutas e hortaliças foram adquiridas no comércio local de Viçosa, MG.

Neste estudo foi empregada a técnica de extração líquido-líquido com partição induzida por sal (ELL-PIS) validada para extração e quantificação dos agrotóxicos em amostras de água, por cromatografia gasosa, usando detector por captura de elétrons (CG-DCE). Posteriormente a metodologia otimizada e validada para determinação de resíduos de agrotóxicos em água foi adaptada para análise das polpas das frutas e hortaliças mencionadas acima.

## 2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1. Reagentes e equipamentos

As soluções empregadas nesta etapa do trabalho foram preparadas pela solubilização de padrões de clorpirifós (99,0% m/m), cipermetrina (92,4% m/m) e deltametrina (99,0% m/m) obtidos da Chem Service (West Chester, PA, USA), tiامتoxam (99,7% m/m) obtida da Sigma-Aldrich (Germany) e bifentrina (92,2 % m/m – FMC do Brasil)

Os solventes acetonitrila (Mallinckrodt, grau HPLC) e acetato de etila (Mallinckrodt) foram empregados como extratores. Solução de cloreto de sódio (Reagen – P.A.) foi utilizada para romper o equilíbrio da solução (efeito *salting out*), sulfato de sódio anidro com grau de pureza superior a 99,0% (Vetec - P.A.) foi empregado para eliminar água dos extratos. O adsorvente florisil (J. B. Barker) usado na etapa de *clean-up* foi condicionado com acetonitrila e acetato de etila em banho ultrassônico por 10 min e secado em estufa a 45 °C.

Os instrumentos utilizados neste trabalho foram: Cromatógrafo a gás da Shimadzu (GC-2014) com detector por captura de elétrons (DCE), equipado com auto-injetor AOC-20i) e uma coluna capilar HP-5 da Agilent Technologies, vórtex (Unique, MAXICLEAN 750), balança analítica (Satorius BP 2215 com precisão de 0,0001 g) e liquidificador industrial (Mallory).

Foram também utilizados frascos de vidro transparente com tampa e septo de Teflon de 22 mL de capacidade e pipetas automáticas para o preparo dos padrões e recolhimento da fase orgânica superior do sistema bifásico, entre outras vidrarias.

### **2.2.2. Preparo de soluções padrão**

Soluções estoque de 500,0 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas pela solubilização de quantidades adequadas dos princípios ativos em acetonitrila (Mallinckrodt/ HPLC) e armazenadas no freezer a - 20 °C.

A partir de diluições das soluções estoque, foram preparadas soluções de trabalho contendo os agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina, deltametrina e bifentrina nos níveis de concentrações (1,25; 2,5 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>). As demais soluções foram obtidas a partir de diluições da solução de trabalho.

### **2.2.3. Amostragem**

Foram adquiridas frutas e hortaliças (maçã, morango, tomate e pimentão) comercializados em Viçosa - MG/Brasil e acondicionadas em sacos de polietileno transparente, identificados e transportados para o laboratório de química analítica (LAQUA) da Universidade Federal de Viçosa para posterior análise. Antes da pesagem dos frutos foram descartadas as hastes.

### **2.2.4. Aplicação do método ELL-PIS em águas de lavagem de frutas e hortaliças e análise de resíduos de agrotóxicos por CG-DCE**

Inicialmente foram medidas as massas das amostras em balança analítica: 345,7820 g de tomate; 329,6310 g de pimentão; 341,4562 g de maçã e 294,2872 g de morango. Em seguida, foram lavados separadamente com 100,0 mL de água destilada, utilizando um pincel sobre as superfícies destes.

Uma alíquota de 3,0 mL da água de lavagem dos frutos foi colocada em contato com 6,0 mL de mistura extratora (5,0 mL de acetonitrila e 1,0 mL de acetato de etila), formando uma fase única. Para romper este equilíbrio foi acrescentado 1,0 mL de solução de NaCl 2,0 mol L<sup>-1</sup>. A mistura foi agitada em vórtex por 40 segundos formando um sistema bifásico devido ao efeito de *salting out*. As misturas foram deixadas em repouso e a fase orgânica superior foi retirada com pipeta automática e os volumes dos extratos ajustados para 5,0 mL. Os ensaios foram realizados em triplicata. Evaporou-se o solvente sob

corrente de ar e o extrato foi recuperado em 1,0 mL de acetonitrila para análise por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons.

### **2.2.5. Adaptação do método ELL-PIS para análise de frutas e hortaliças *in natura***

As mesmas amostras de frutas (morango/maçã) e hortaliças (pimentão /tomate) adquiridas no comércio local de Viçosa-MG, após terem sido lavadas separadamente, foram fracionadas e homogeneizadas em liquidificador industrial e, em seguida, armazenadas em potes de plástico, no freezer a -20 °C, até o momento da análise.

O método otimizado e validado para análise de agrotóxicos em água foi adaptado para matrizes sólidas. Para cada ensaio realizado em triplicata foram medidas 3,0000 g da polpa dos frutos (maçã, tomate, pimentão e morango) em frasco de vidro transparente de 22,0 mL de capacidade e acrescentados de 0,5 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 6,0 mL de mistura extratora (5,0 mL de acetonitrila e 1,0 mL de acetato de etila). Para romper este equilíbrio foi acrescentado 1,0 mL de solução de NaCl 2,0 mol L<sup>-1</sup> (efeito *salting out*). A mistura foi submetida à homogeneização em vórtex por 40 segundos e deixada em repouso (cerca de um minuto), a fim de ocorrer melhor estabilização das fases. Após esse período, foi obtido um sistema bifásico constituído da fase sólida (formada pela polpa com retenção de um líquido turvo) e da fase líquida (sobrenadante límpido) sem formação de emulsão.

Em seguida, a fase orgânica superior foi retirada com pipeta automática e o volume dos extratos ajustados para 5,0 mL com acetonitrila. Os extratos de cada matriz (branco) foram injetados no CG-DCE com objetivo de averiguar a qualidade dos cromatogramas e a possível presença dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina, deltametrina e bifentrina.

### **2.2.6. Curva analítica preparada em solvente puro**

Foram preparadas soluções padrão de concentrações crescentes dos analitos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina, deltametrina e bifentrina (25, 50 e 100 µg L<sup>-1</sup>) utilizando o principal solvente da mistura extratora (acetonitrila). Não foi utilizado padrão interno nesta etapa. Após a análise cromatográfica,

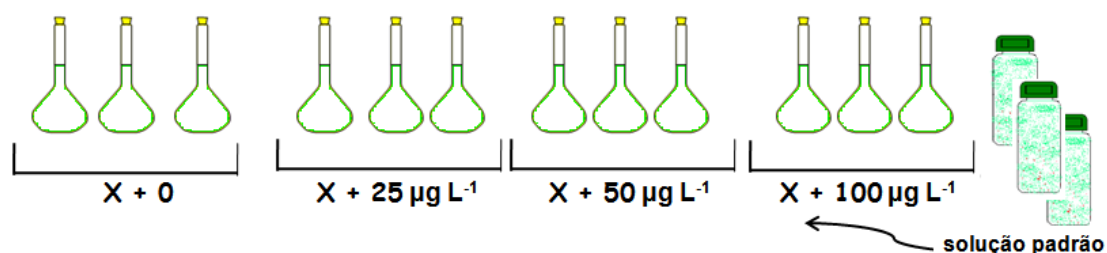
foram construídas curvas analíticas, relacionando as áreas com as concentrações dos analitos.

### 2.2.7. Curva analítica preparada no extrato da matriz (branco)

Nesta etapa foi aplicado o método de adição de padrão para as mesmas amostras (maçã, morango, pimentão e tomate) adquiridas no comércio de Viçosa-MG e utilizadas nos itens 2.2.4 e 2.2.5.

Inicialmente foram produzidos aproximadamente 140,0 mL de extrato referente a cada matriz das amostras conforme descrito (item 2.2.5). A metade destes extratos (70,0 mL) foi submetida a etapa de *clean-up*, onde cada 5,0 mL do extrato (branco) foi passado por uma coluna de polietileno contendo 2,0 g do adsorvente florisil na camada inferior e 1,5 g de sulfato de sódio anidro na parte superior da coluna, afim de eliminar o excesso de água. Os extratos foram recolhidos em erlenmeyer e refrigerados para posterior utilização.

Após o processo de *clean-up*, todo extrato obtido foi acondicionado em um mesmo recipiente e, em seguida, homogeneizado. Em balões volumétricos de 5,0 mL foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de soluções de concentração 1,25; 2,5 e 5,0  $\text{mg L}^{-1}$  para os princípios ativos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina, deltametrina e bifentrina. Em uma série de balões, o volume final foi completado para 5,0 mL com o extrato da matriz (branco) obtidos pelo método. Após passar pela etapa de *clean-up*, uma outra série de soluções foi preparada aferindo o volume do balão para 5,0 mL com o extrato da matriz, sem essa ter passado pela etapa de *clean-up*, de modo que a concentração final da solução fosse igual a 25, 50 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A Figura 2.1 representa o método de adição padrão aplicado nos extratos das matrizes em estudo.



**Figura 2.1** – Esquema do método de adição padrão aplicado aos extratos de morango, maçã, pimentão e tomate (com e sem *clean-up*).

Primeiramente, foram realizadas injeções sucessivas de soluções padrão em acetonitrila contendo os cinco agrotóxicos investigados. As injeções eram da menor concentração para a maior (25, 50 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e cada uma era injetada três vezes.

Na segunda etapa, foram injetados os extratos das matrizes (branco com *clean up*), seguido de injeções de soluções-padrão preparadas em extratos da matriz (com *clean-up*).

Na terceira etapa, foram injetados os extratos das matrizes (branco sem *clean up*), seguido de injeções de soluções-padrão preparadas em extratos da matriz (sem *clean-up*).

Cada série foi realizada em triplicata e para cada matriz em estudo, utilizando sempre as mesmas condições cromatográficas. Após as injeções no CG-DCE e análise dos dados, foram construídas três curvas analíticas dos padrões de analitos, sendo uma no solvente puro e as outras duas nos extratos das matrizes (com e sem *clean-up*)

#### **2.2.8. Quantificação dos resíduos de agrotóxicos presentes no extrato da água de lavagem e nos extratos dos frutos *in natura***

A quantificação dos princípios ativos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina, deltametina e bifentrina nos extratos das águas de lavagem das amostras de morango, maçã, pimentão e tomate e nos frutos *in natura* após a processo de lavagem, foi realizada comparando-se a área do analito obtidas no extrato com a de soluções padrão dos princípios ativos em acetonitrila .

## 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1. Análise da água de lavagem de frutas e hortaliças pelo método ELL-PIS e determinação por cromatografia gasosa

De forma geral, a aplicação de agrotóxicos está presente na maior parte das culturas, mas as que mais trazem preocupação são aquelas consumidas *in natura* em grande quantidade pela população (ANVISA, 2006).

Lavagem geralmente é o primeiro passo em diversos tipos de tratamentos que são dados ao preparo tanto de alimentos domésticos como comerciais. Essa etapa preliminar pode ser combinada de várias formas como lavagem, seguida por cozimento, lavagem e secagem, lavagem e descascamento para permitir eficaz descontaminação de pesticidas (KAUSHIK *et al.*, 2009).

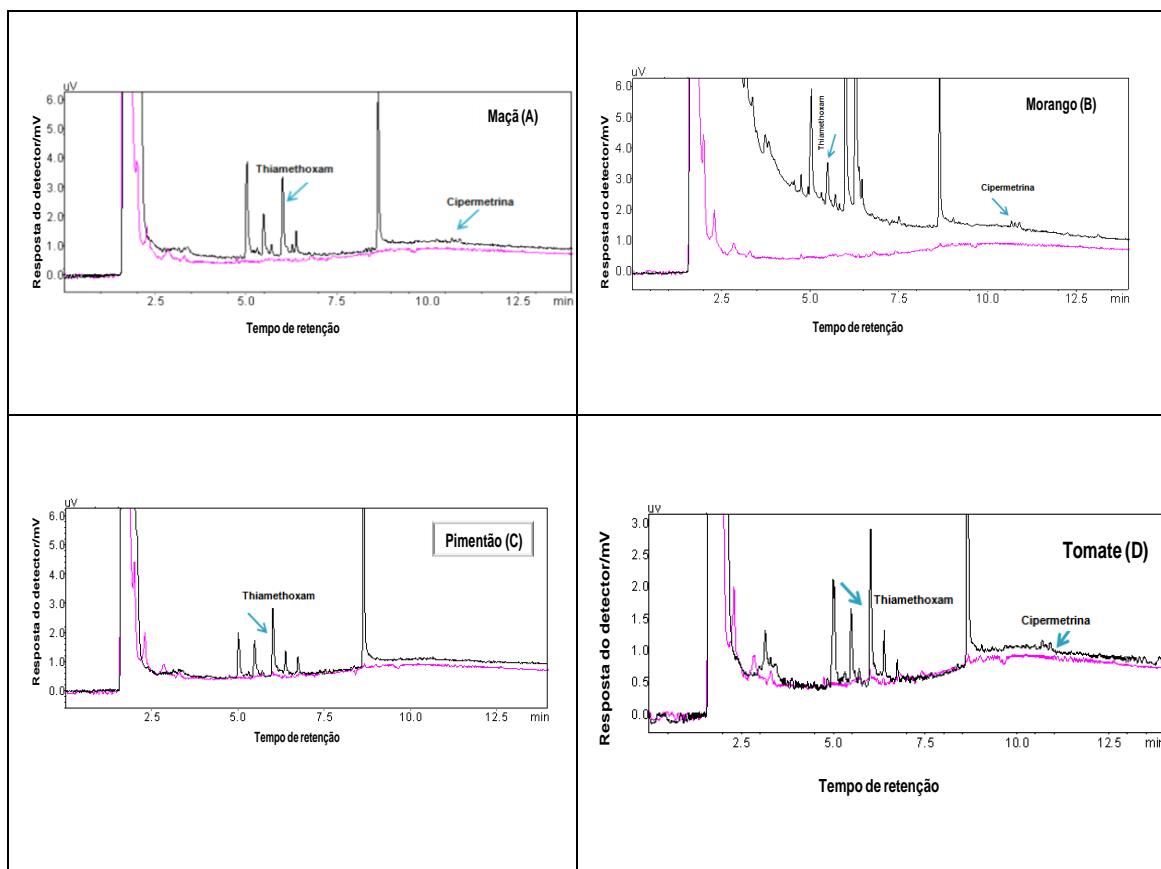
Para determinar a quantidade de agrotóxicos removidos a partir do fruto devido ao processo de lavagem, foram adquiridas no mercado local de Viçosa-MG maçã, morango, pimentão e tomate. O objetivo desta etapa do trabalho foi examinar a água de lavagem de frutas e hortaliças quanto à presença de resíduos dos agrotóxicos: clorpirifós, tiametoxam, bifentrina, cipermetrina e deltametrina. Após o processo de lavagem das frutas e hortaliças (item 2.2.4), somente a água do morango apresentou-se com coloração meio rosada e com algumas partículas removidas dos poros deste, onde esta foi filtrada com papel de filtro com 0,45 µm de porosidade, a fim de eliminar o material em suspensão.

Alíquotas das águas de lavagem das frutas e hortaliças foram submetidas ao método de extração líquido-líquido com partição induzida por sal validado conforme descrito no (item 2.2.4) e analisadas por cromatografia gasosa. A identificação dos compostos de interesse foi realizada comparando o

tempo de retenção do composto da amostra com o de um padrão (COLLINS *et al.*, 2006).

Após injeção dos extratos no CG-DCE observou-se nos cromatogramas das amostras de água de lavagem dos frutos e hortaliças um pico em 5,9 min coincidente com o tempo de retenção do tiametoxam em todas as amostras. Observou-se também um pico em 10,9 min coincidente com o tempo de retenção da cipermetrina no extrato da maçã, morango e tomate. Outros picos bem maiores, cujos tempos de retenção não coincidiam com os dos compostos analisados foram observados.

Os resultados apresentados neste estudo mostram que a lavagem convencional de um alimento com água pode reduzir os níveis residuais de agrotóxicos presentes nas frutas e hortaliças. Na Figura 2.2 está representando em rosa os cromatogramas (A, B, C, D) dos extratos obtido da matriz água isenta de agrotóxicos e em preto os cromatogramas (A, B, C, D) de extratos obtidos da água de lavagem de maçã, morango, pimentão e tomate, respectivamente, e posterior análise por CG-DCE. A maioria dos resíduos dos agrotóxicos parece residir na superfície do produto e pode ser removida pela ação mecânica.



**Figura 2.2** - Cromatogramas (A, B, C, D) dos extratos obtidos da matriz água isenta de agrotóxicos ( \_\_\_ ) e cromatogramas (A, B, C, D) de extratos obtidos da água de lavagem de maçã, morango, pimentão e tomate, respectivamente, ( \_\_\_ ) após extração pelo método ELL-PIS e análise por CG-DCE.

Pode-se observar que no cromatograma (B), referente ao extrato da água de lavagem dos morangos apresentou maior variação da linha de base. Este fato é decorrente da presença de co-extrativos adquiridos durante o processo de lavagem do fruto, como mencionado no item 2.3.1.

### 2.3.2. Adaptação do método ELL-PIS para análise de frutas e hortaliças

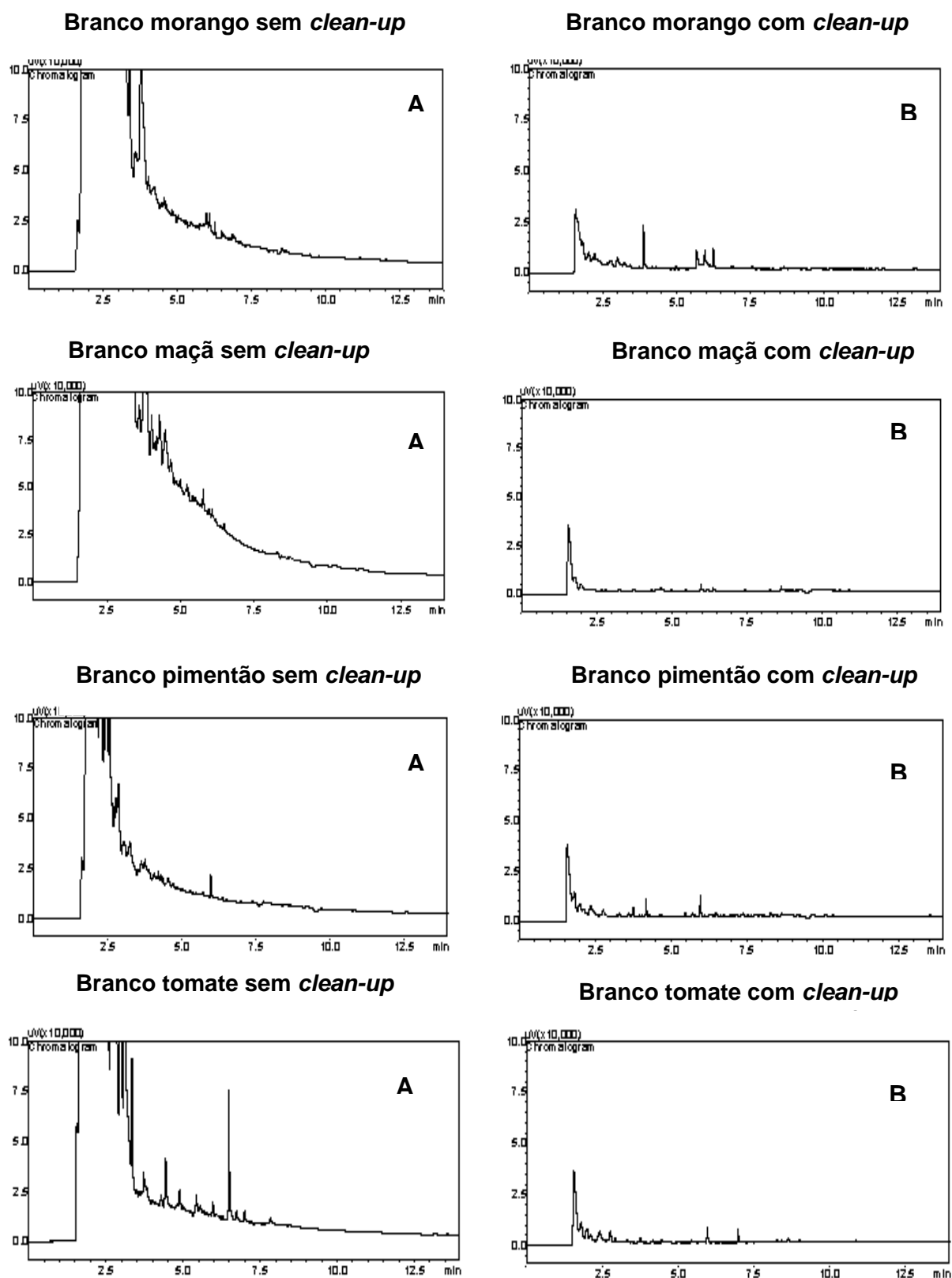
As amostras de frutas e hortaliças provenientes dos mercados de Viçosa-MG, após passarem pelo processo de lavagem (item 2.2.4), foram homogêneas em liquidificador e adaptadas ao método de extração líquido-líquido com partição induzida por sal (efeito *salting out*) conforme descrito no item 2.2.5. Os extratos orgânicos do sistema bifásico obtidos apresentavam

uma coloração amarelo claro para a maçã e vermelho, amarelo e verde intensos para as matrizes morango, tomate e pimentão, respectivamente.

Portanto, numa primeira avaliação visual, os extratos não se mostravam impuros, eram límpidos e transparentes, mas quando eram injetados no cromatógrafo a gás a resposta cromatográfica era afetada pela presença de co-extrativos presentes nas amostras. As quatro matrizes estudadas são bastante complexas, portanto, ricas em pigmentos como carotenos, luteína + zeaxantina, entre outros (USDA, 2009). A presença dessas substâncias nas amostras analisadas, além de afetar a qualidade dos cromatogramas, podem causar problemas no detector e mais ainda em sítios do injetor (MENKISSOGLU-SPIROUDI & FOTOPOULOU, 2004).

No intuito de melhorar a qualidade dos cromatogramas das matrizes maçã, morango, pimentão e tomate, os extratos orgânicos obtidos a partir do método de análise foram submetidas a uma etapa de *clean up*. Após a formação do sistema bifásico, a fase orgânica superior foi retirada e eluída por gravidade em um coluna de polietileno contendo adsorvente (florisil) e sulfato de sódio anidro, conforme mencionado no item 2.2.7. O extrato obtido foi recuperado em balão volumétrico de 5,0 mL e armazenado no freezer, até o momento da análise por CG-DCE.

Dentre os diversos métodos empregados para minimizar o efeito de matriz, o *clean up* dos extratos é o único que efetivamente elimina a causa do problema, ou seja, a remoção dos componentes da matriz (PINHO, 2009). Dentre os adsorventes testados por Pinho (2009), o florisil proporcionou maiores porcentagens de recuperação dos compostos (> 80 %) e extratos adequados para análise cromatográfica. Na Figura 2.3 estão representados os cromatogramas referentes aos extratos do branco da matriz morango, maçã, pimentão e tomate sem a etapa de *clean-up* (A) e os cromatogramas referentes aos extratos do branco da matriz com *clean-up* (B).



**Figura 2.3** - (A) Cromatogramas obtidos dos brancos das matrizes (sem *clean-up*).  
 (B) Cromatogramas obtidos dos brancos das matrizes (com *clean-up*).

Avaliando-se a qualidade dos cromatogramas dos brancos das quatro matrizes, percebe-se que aqueles obtidos de extratos que não passaram pela etapa de *clean-up* obtiveram resultados insatisfatórios. Os co-extrativos interferem na resposta do detector fazendo com que os cromatogramas apresentaram acentuada variação da linha de base.

Quando os co-extrativos alcançam a coluna cromatográfica, estes podem interagir com a fase estacionária causando decomposição da mesma, formando produtos que são arrastados para fora da coluna. Esta deformidade pode gerar instabilidade na linha de base bem como mudanças nas suas características de retenção (COLLINS *et al.*, 2006).

A etapa de *clean-up* introduzida no procedimento proporcionou extratos mais claros para as amostras, menor quantidade de componentes da matriz e melhor estabilidade da linha de base dos cromatogramas. Embora o processo de limpeza dos extratos possa resultar em perda de alguns compostos, bem como aumentar o tempo e o custo das análises, o desenvolvimento desta etapa, se faz necessária para minimizar as impurezas dos extratos (reduzir o efeito de matriz) e assim evitar danos, tanto para as análises quanto para o sistema cromatográfico (HAJSLOVÁ *et al.*, 1998).

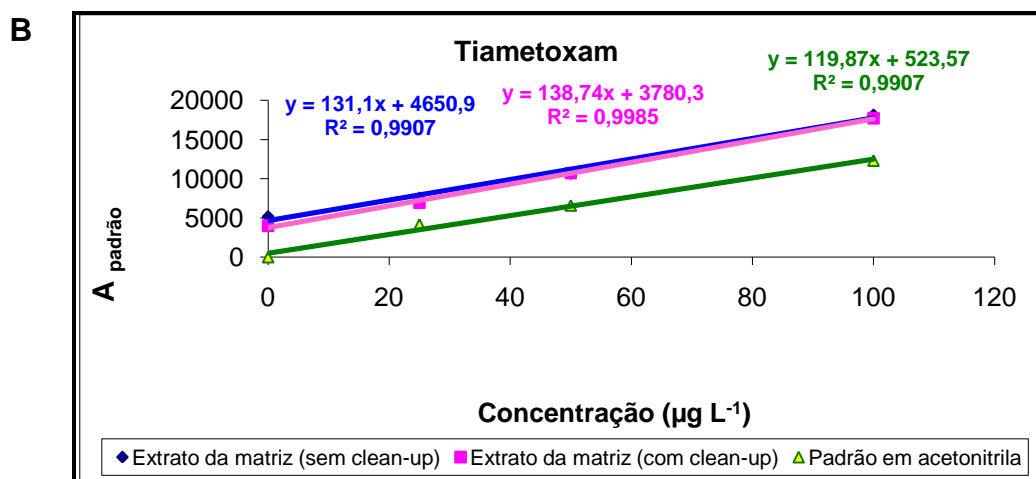
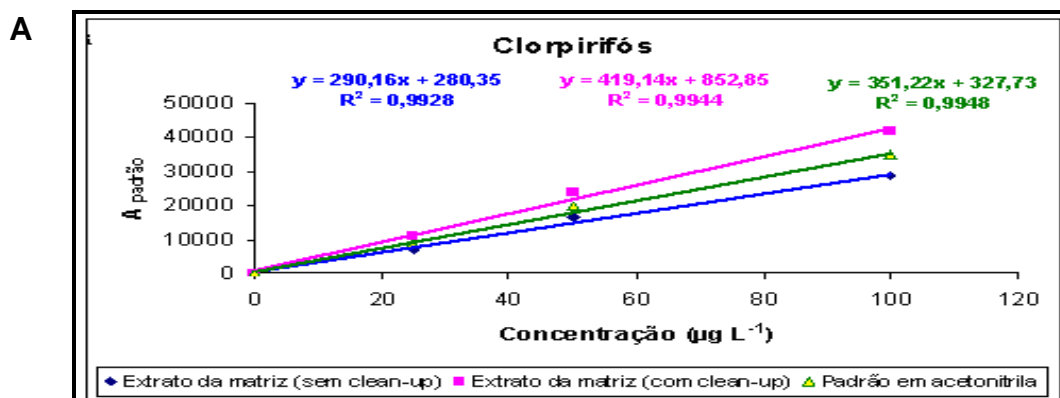
### **2.3.3. Curva analítica preparada em solvente puro e no extrato da matriz (Método de adição de padrão)**

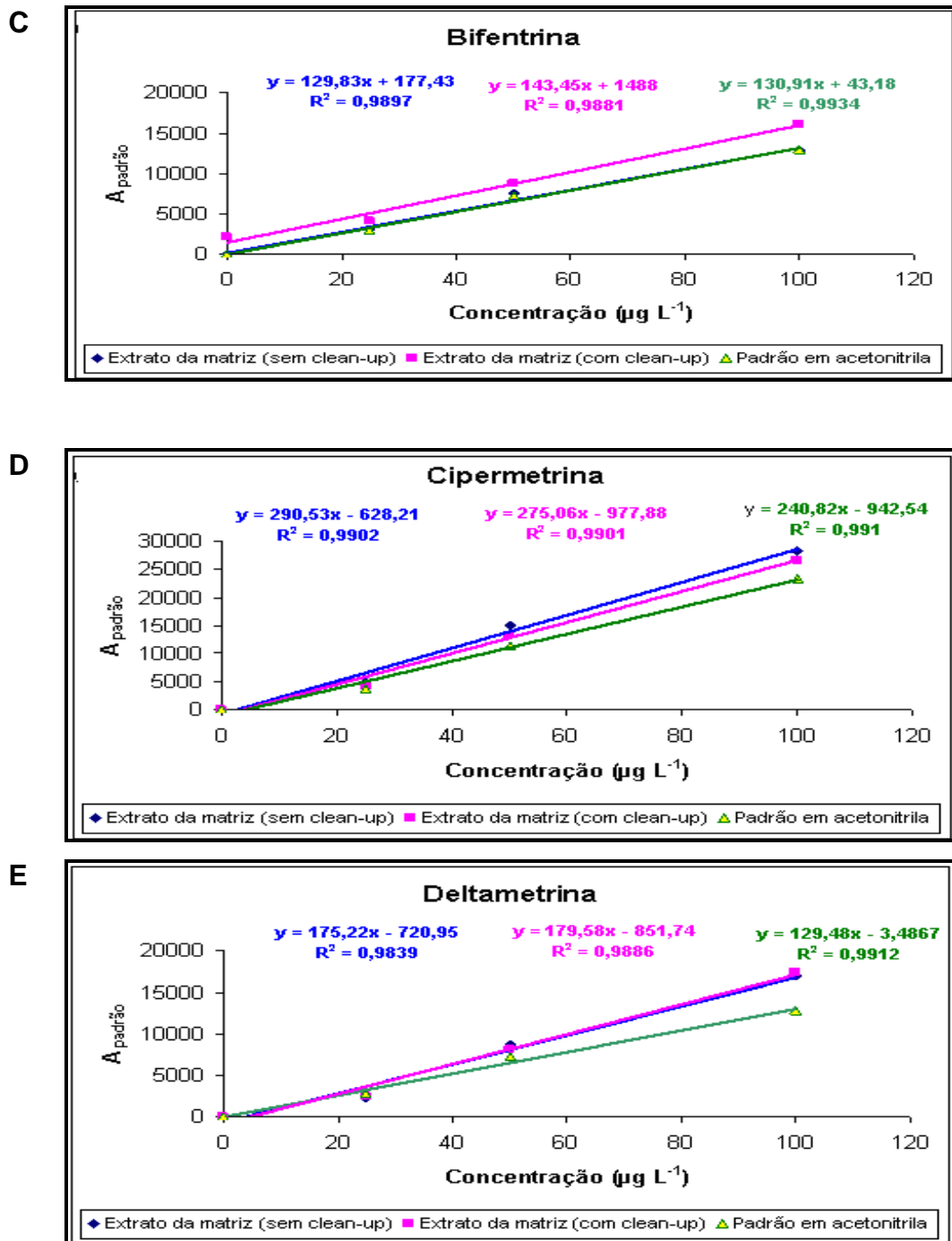
O método de adição de padrão é uma ferramenta que pode ser utilizada para corrigir a influência dos componentes da matriz na quantificação exata de agrotóxico numa amostra individual. A amostra contendo o agrotóxico de interesse é submetida a um processo de extração, e o extrato obtido é dividido em uma série de subamostras. Quantidades diferentes e conhecidas de padrões do agrotóxico são adicionadas em cada subamostra, que são aferidas para o mesmo volume, e analisadas nas mesmas condições cromatográficas. A concentração do agrotóxico é determinada por regressão linear (LEHOTAY, 1997). As desvantagens deste método é que, para cada amostra, é necessário construir uma curva analítica (PINHO, 2009).

Para avaliar a influência dos componentes da matriz na resposta do detector, foram preparadas três séries de soluções-padrão contendo os cinco agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina, deltametrina e bifentrina. nas concentrações de 25; 50 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  em solvente puro, extratos da matriz (com *clean-up*) e no extrato da matriz (sem *clean-up*). Após a injeção das soluções no cromatógrafo a gás, conforme descrito no item 2.2.7, os agrotóxicos foram quantificados.

Após análise dessas soluções, construíram-se três curvas de adição de padrão para cada princípio ativo, relacionando as áreas do pico atribuído à substância de interesse com a concentração (variável) do agrotóxico. Por regressões lineares foram obtidas as equações das retas, as quais foram utilizadas no cálculo das concentrações dos agrotóxicos nos extratos das amostras. As curvas preparadas em solvente puro e em extratos de maçã, morango, tomate e pimentão (com e sem *clean-up*) se encontram nas Figuras (2.4 a 2.7).

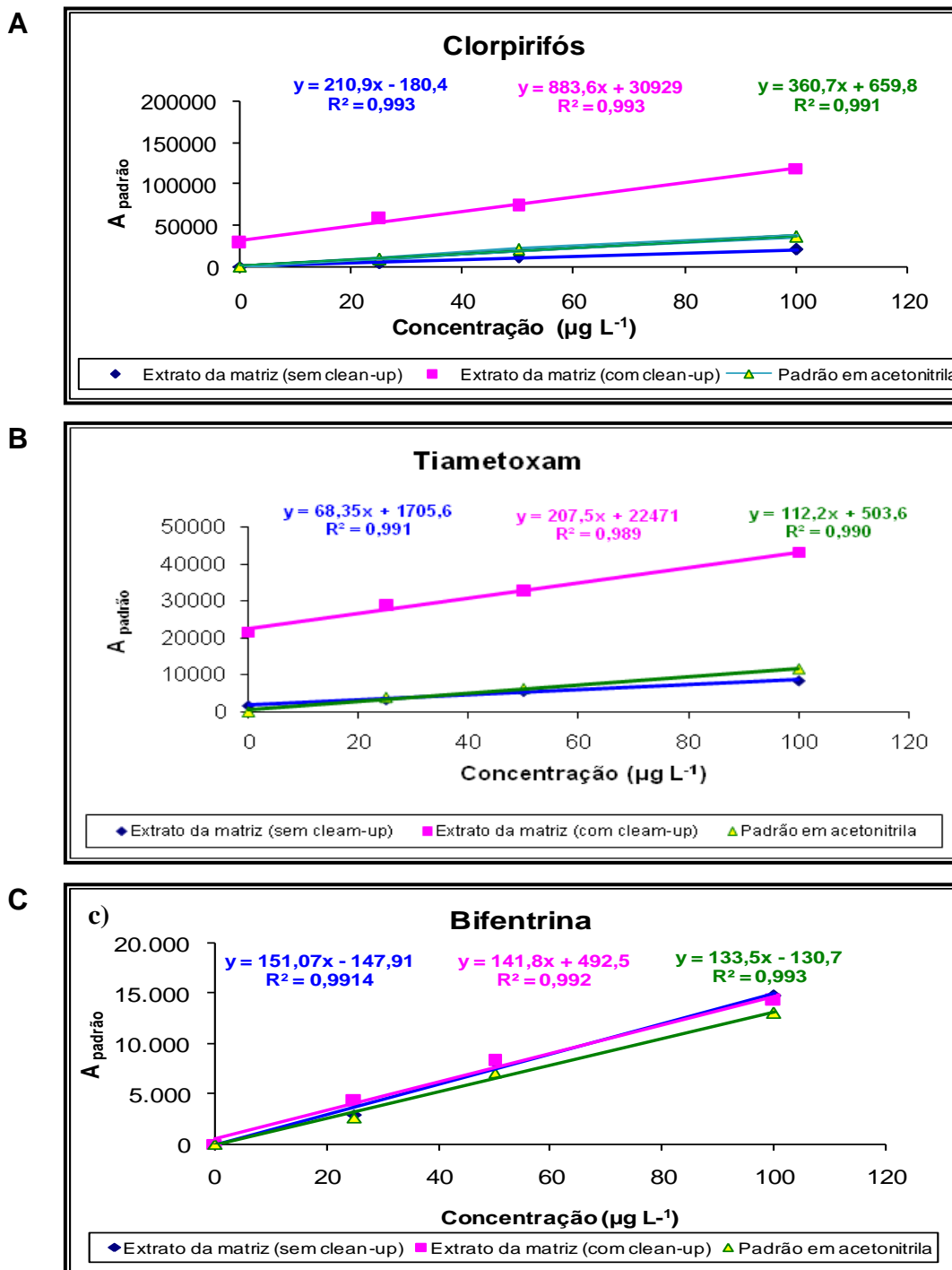
## MAÇÃ





**Figura 2.4** - Curvas de adição de padrão dos princípios ativos (A) clorpirifós, (B) tiametoxam, (C) bifentrina (D) cipermetrina e (E) deltametrina preparadas em acetonitrila e em extrato de maçã (com e sem *clean-up*).

## MORANGO



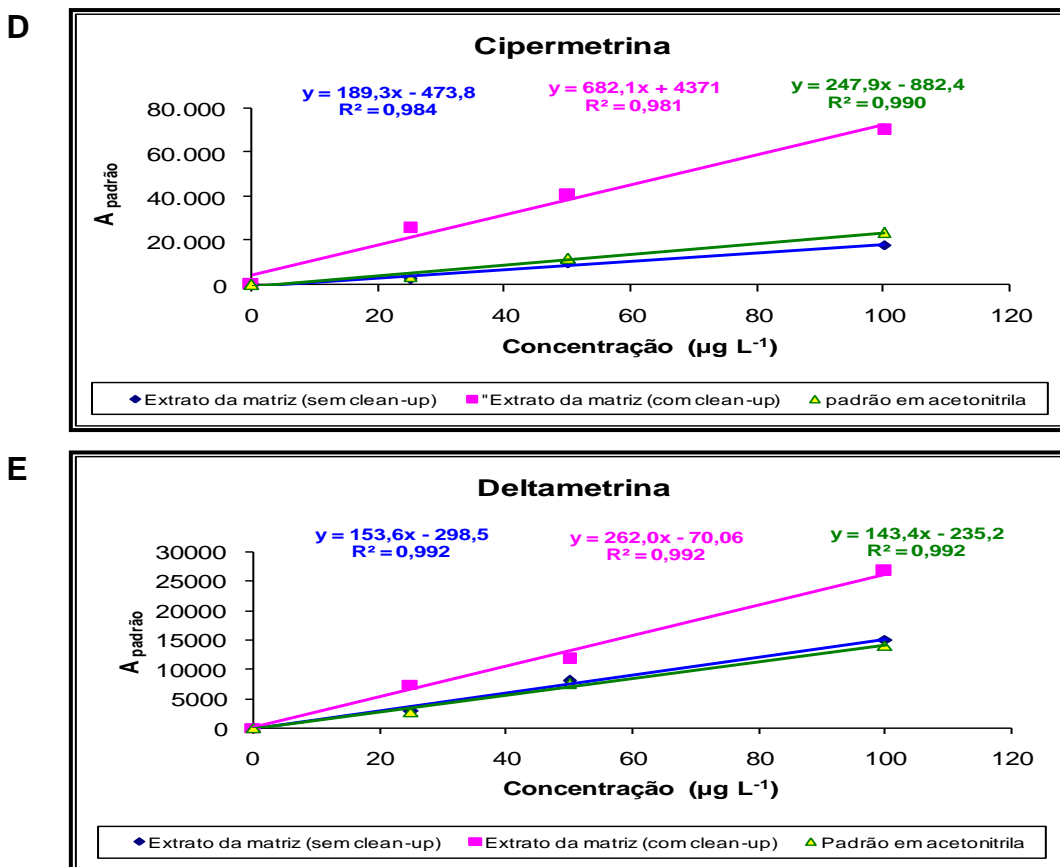
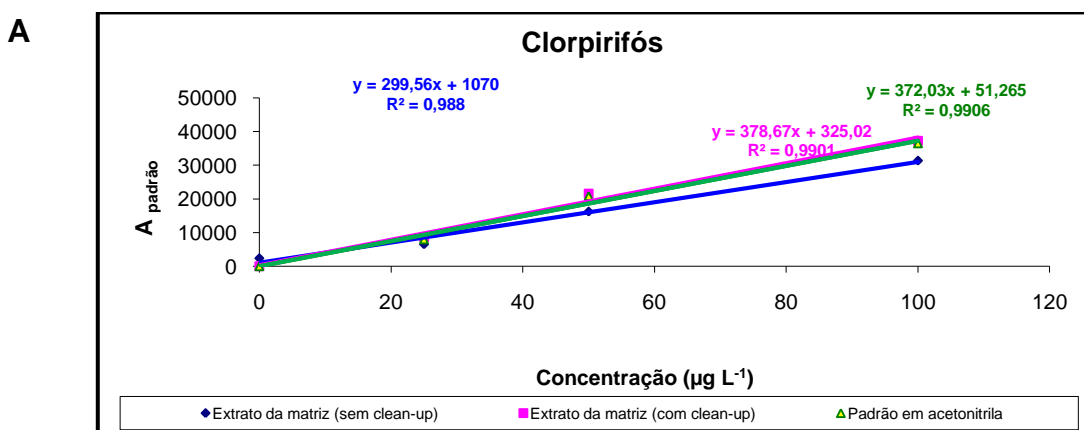
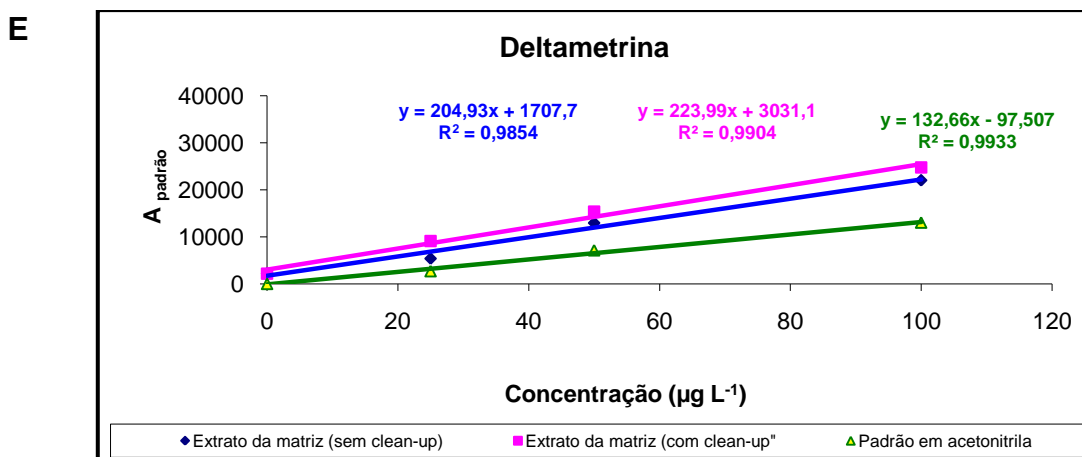
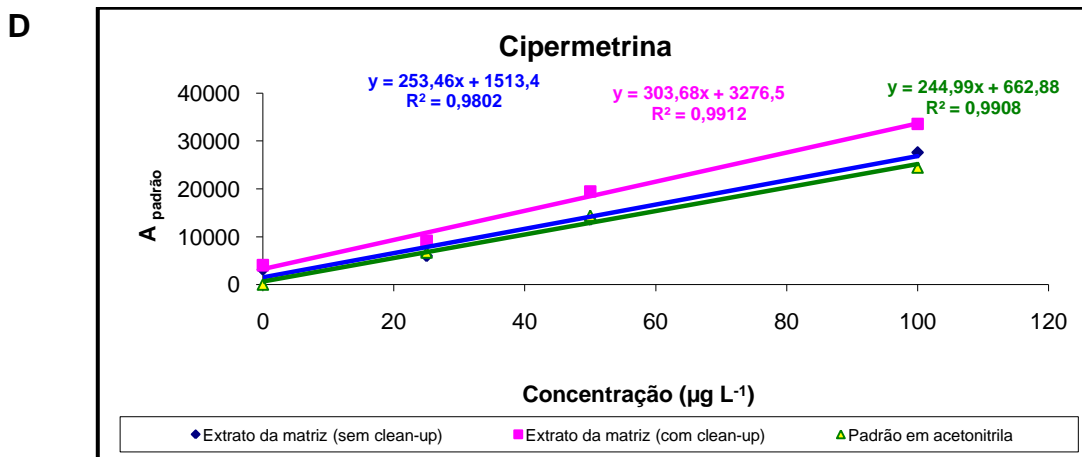
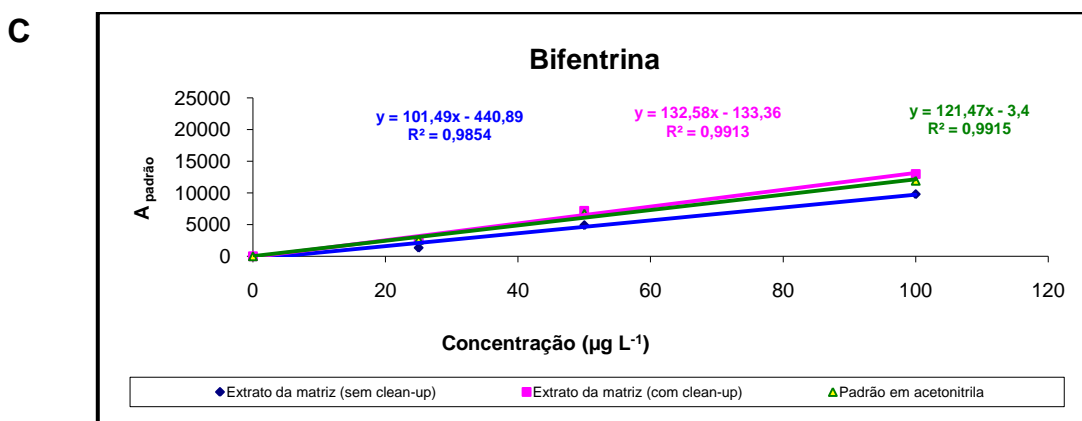
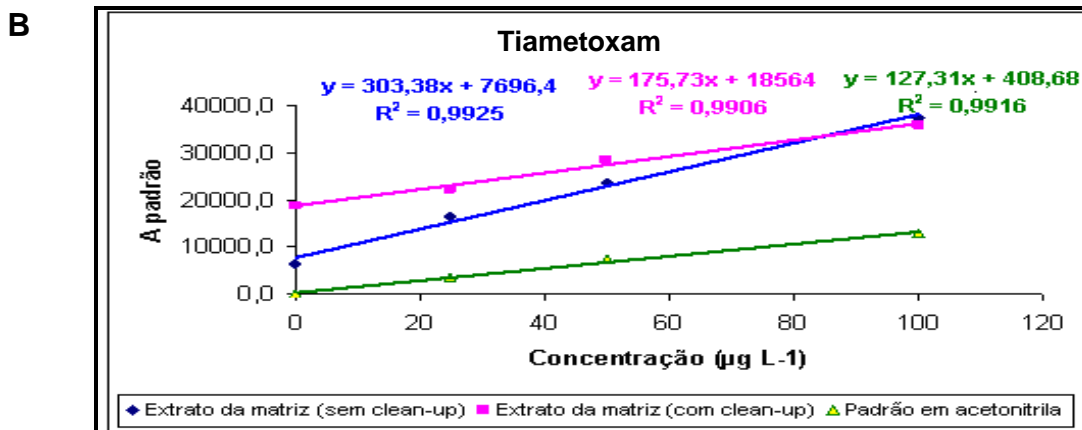


Figura 2.5 - Curvas de adição de padrão dos princípios ativos (A) clorpirifós, (B) tiametoxam, (C) bifentrina (D) cipermetrina e (E) deltametrina preparadas em acetoneitrila e em extrato de morango (com e sem *clean-up*).

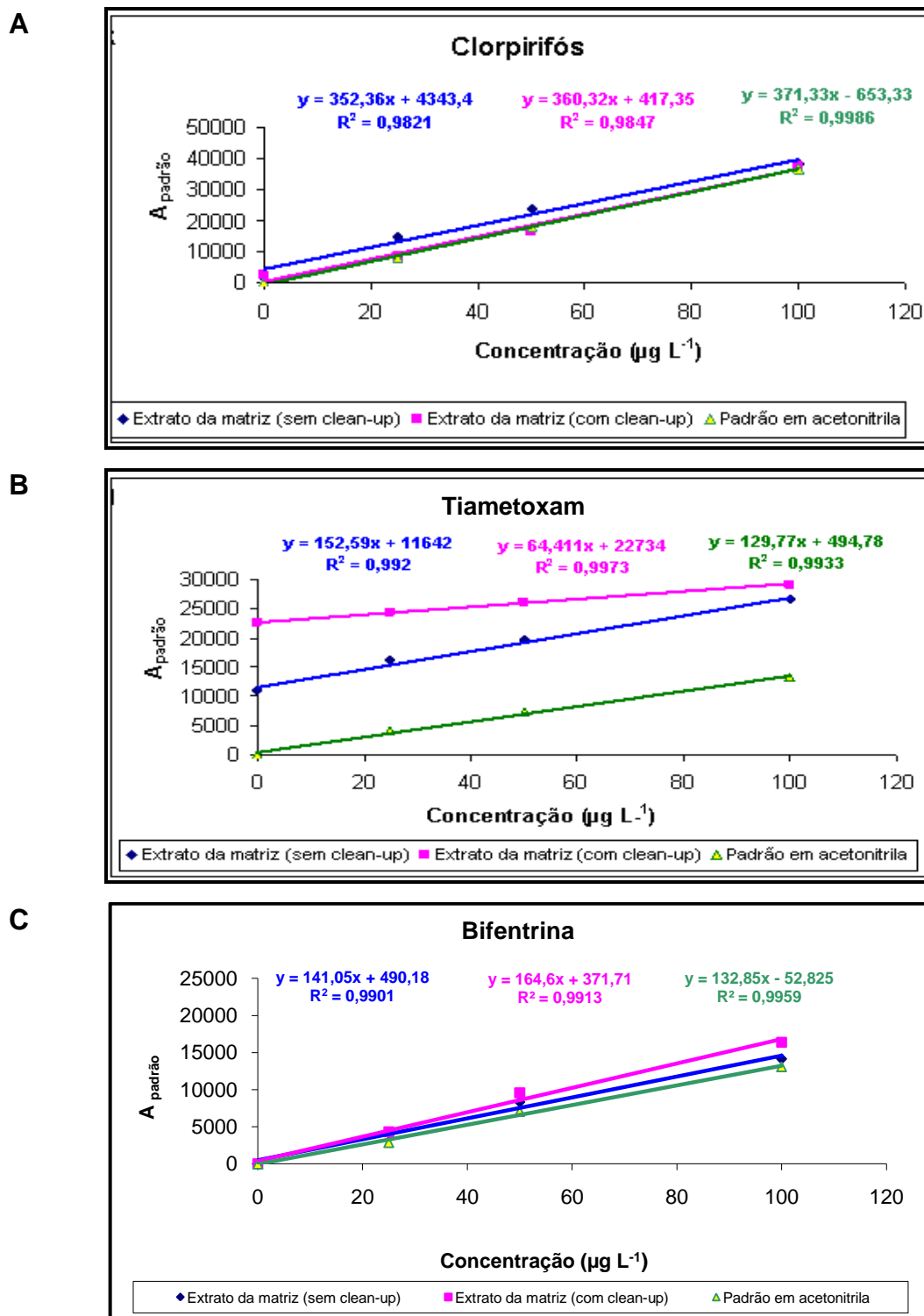
### TOMATE

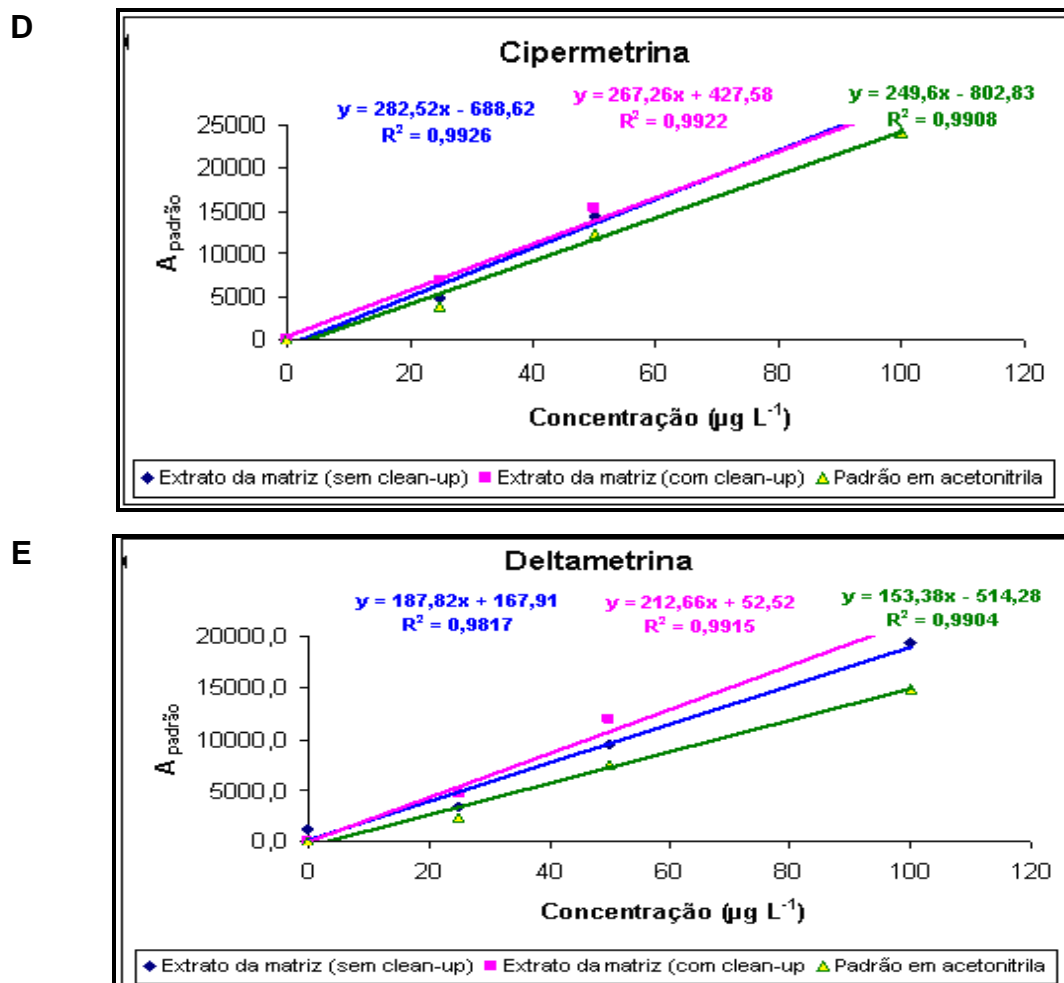




**Figura 2.6** - Curvas de adição de padrão dos princípios ativos (A) clorpirifós, (B) tiametoxam, (C) bifentrina (D) cipermetrina e (E) deltametrina preparadas em acetonitrila e em extrato de tomate (com e sem *clean-up*).

## PIMENTÃO





**Figura 2.7** - Curvas de adição de padrão dos princípios ativos (a) clorpirifós, (b) tiametoxam, (c) bifentrina (d) cipermetrina e (d) deltametrina. preparadas em acetonitrila e em extrato de pimentão (com e sem *clean-up*).

Podemos observar na Figura 2.3 (cromatogramas), que as frutas e hortaliças adquiridas no comércio de Viçosa estavam contaminadas com resíduos dos agrotóxicos investigados neste estudo. Isso pôde ser visualizado quando se injetava o extrato da matriz (branco) sem ser fortificado com padrões.

Quando soluções padrão preparadas em solvente puro e analisadas por cromatografia gasosa, apresentam respostas diferentes das mesmas soluções padrão preparadas no extrato da matriz (branco), caracteriza-se o efeito de matriz. Nas Figuras 2.4 a 2.7 podemos observar que a inclinação das curvas analíticas preparadas no solvente puro e nos extratos das matrizes (com e sem

*clean-up*) não são concordantes, o que sugere a evidência de efeito de matriz para os agrotóxicos em estudo.

Para os cinco agrotóxicos analisados, observou-se que as curvas analíticas diferenciam tanto pelo coeficiente angular quanto linear. Quando somente o coeficiente angular varia os componentes da matriz contribuem para introduzir nos resultados um erro sistemático proporcional. Quando apenas o coeficiente linear varia, significa que existe um erro sistemático constante. Quando os componentes da matriz introduzem este tipo de erro, a diferença entre a área do agrotóxico em solvente puro e em extrato da matriz tende a assumir um valor único, independente da concentração do agrotóxico, e as curvas analíticas são paralelas (CUADROS-RODRIGUEZ *et al.*, 2003)

A expressão “aumento da resposta cromatográfica induzida por componentes da matriz”, ou simplesmente “efeito de matriz”, é utilizada para explicar as diferenças nas respostas do detector em análises de agrotóxicos por cromatografia em fase gasosa (CG). Esse fenômeno é comumente observado quando é obtida eficiência de extração de pesticida superior a 100% em análise de amostras complexas (HAJSLOVÁ *et al.*, 1998). Fatores como tipo de matriz, concentração do agrotóxico na amostra, tipo de injetor e temperatura do sistema cromatográfico podem influenciar também nos resultados (ERNEY *et al.*, 1993).

Em análises de resíduos de agrotóxicos em extratos de matrizes complexas os componentes endógenos destas podem interferir na quantificação dos pesticidas (PINHO *et al.*, 2009) O efeito de matriz, pode causar alterações na análise cromatográfica, como: mascaramento do pico do analito de interesse, gerando um resultado falso negativo. Isso ocorre, por exemplo, quando há perdas de quantidade do agrotóxico no sistema de injeção, fornecendo baixa resposta e dificultando a integração (SANCHEZ-BRUNETE *et al.*, 2005). Também pode acarretar aumento no sinal do detector, levando à superestimação do resultado. Isso ocorre quando impurezas voláteis são eluídas com mesmo tempo de retenção dos agrotóxicos (HAJSLOVÁ *et al.*, 2003).

### 2.3.4. Resíduos de agrotóxicos presentes no extrato da água de lavagem de frutas e hortaliças e no fruto *in natura*

A quantificação dos princípios ativos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina, deltametrina e bifentrina foi realizada nos extratos das matrizes (branco) que passaram pela etapa de *clean-up*. A análise quantitativa dos compostos nos extratos (sem *clean-up*) não foi possível, uma vez que, os cromatogramas estavam muito afastados da linha de base, este fato é decorrente da presença de impurezas extraídas das matrizes dificultando a resposta do detector.

Os dados dos frutos *in natura* após a lavagem foram calculados a partir do método de adição padrão descrito no item 2.3.3. Os níveis residuais dos agrotóxicos encontrados nos extratos da água de lavagem dos frutos e no fruto *in natura* comparados com o limite máximo de resíduo estabelecido pela legislação brasileira (Anvisa) se encontram nas Tabelas 2.3 a 2.6.

**Tabela 2.3** – Resíduos de agrotóxicos provenientes dos extratos da água de lavagem de morangos e nos frutos *in natura* após serem lavados e seus respectivos limite máximo de resíduo (LMR).

<b>Morango</b>			
Agrotóxicos	Água de lavagem dos frutos ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Fruto após lavagem ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LMR ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Anvisa)
Clorpirifós	nd	58,0	na
Tiametoxam	95,0	180,0	100,0
Cipermetrina	5,0	10,0	na
Deltametrina	nd	nd	na
Bifentrina	nd	nd	na

nd = agrotóxico não detectado      na = agrotóxico não autorizado neste tipo de cultura

**Tabela 2.4** – Resíduos de agrotóxicos provenientes dos extratos da água de lavagem de maçãs e nos frutos *in natura* após serem lavados e seus respectivos limite máximo de resíduo (LMR).

<b>Maçã</b>			
Agrotóxicos	Água de lavagem dos frutos ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Fruto após lavagem ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LMR ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Anvisa)
Clorpirifós	nd	nd	1000,0
Tiametoxam	35,0	45,0	20,0
Cipermetrina	3,0	nd	na
Deltametrina	nd	nd	20,0
Bifentrina	nd	17,0	na

nd = agrotóxico não detectado      na = agrotóxico não autorizado neste tipo de cultura

**Tabela 2.5** – Resíduos de agrotóxicos provenientes dos extratos da água de lavagem de pimentões e nos frutos *in natura* após serem lavados e seus respectivos limite máximo de resíduo (LMR).

<b>Pimentão</b>			
Agrotóxicos	Água de lavagem dos frutos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Fruto após lavagem ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	LMR ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (Anvisa)
Clorpirifós	nd	nd	na
Tiametoxam	28,0	580,0	20,0
Cipermetrina	nd	nd	na
Deltametrina	nd	nd	10,0
Bifentrina	nd	nd	na

nd = agrotóxico não detectado      na = agrotóxico não autorizado neste tipo de cultura

**Tabela 2.6** – Resíduos de agrotóxicos provenientes dos extratos da água de lavagem de pimentões e nos frutos *in natura* após serem lavados e seus respectivos limite máximo de resíduo (LMR).

<b>Tomate</b>			
Agrotóxicos	Água de lavagem dos frutos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Fruto após lavagem ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	LMR ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (Anvisa)
Clorpirifós	nd	nd	na
Tiametoxam	40,0	176,0	1000,0
Cipermetrina	3,0	17,0	100,0
Deltametrina	nd	22,0	30,0
Bifentrina	nd	nd	20,0

nd = agrotóxico não detectado

na = agrotóxico não autorizado neste tipo de cultura

Desta forma, podemos observar um alto índice de irregularidades referentes aos resíduos de agrotóxicos presentes nas frutas e hortaliças em estudo, pois estes foram detectados tanto no extrato da água de lavagem como nos frutos *in natura* após terem passados pelo método de extração e análise por CG-DCE.

Foi constatada a presença de resíduos do princípio ativo tiametoxam nas culturas do morango, maçã e pimentão com valores acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira. Também foi detectada a presença de resíduos de cipermetrina/clorpirifós no morango e bifentrina na maçã, sendo que estes agrotóxicos não são permitidos para estas culturas. Os resultados encontrados para o tomate foram satisfatórios, pois os resíduos de agrotóxicos detectados estavam de acordo com a legislação vigente no país.

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que a lavagem convencional de frutas e hortaliças com água não remove completamente os resíduos de agrotóxicos presentes nestes. Segundo a Anvisa, o modo de ação dos agrotóxicos cipermetrina, deltametrina e bifentrina é por contato, já o tiametoxam é um agrotóxico sistêmico. O processo de lavagem remove somente os agrotóxicos que agem por contato, ou seja, que estão na superfície dos frutos, mas mesmo estes podem vir a penetrar nas porosidades do fruto, não sendo removidos com o simples ato de lavagem. Desta forma, podemos observar que os resíduos de tiametoxam se encontravam tanto na água de

lavagem como nos frutos *in natura*, uma vez que foram absorvidos para os tecidos internos da planta.

Nessa avaliação, deve-se considerar que os resultados apresentados indicam que os estudos utilizando lavagem de frutas e hortaliças contendo resíduos de agrotóxicos em testes de laboratório, provavelmente irão gerar dados que não refletem as condições normais de lavagem de alimentos no cotidiano. De forma geral, os resultados apresentados servem de alerta para a população consumidora, produtores rurais e para os órgãos de fiscalização.

É necessário que se tenha um controle mais rígido em relação ao uso dos agrotóxicos, respeitando os LMRs estabelecidos pela legislação, o tipo de cultura a ser utilizado, assim como período de carência, de modo a reduzir os riscos oferecidos ao meio ambiente e à saúde pública.

## CONCLUSÕES

Para a realização deste trabalho foi otimizado e validado o método de Extração Líquido-Líquido com Partição Induzida por Sal (ELL-PIS) para análise simultânea dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina em água por cromatografia gasosa.

Na etapa de otimização foram avaliadas as variáveis: proporção amostra:solvente extrator (água / acetonitrila / acetato de etila), concentração salina, tipo e tempo de agitação das amostras, afim de estabelecer as melhores condições de análise dos compostos em estudo. Já na etapa de validação foram avaliados os parâmetros de seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão do método.

Diante dos resultados obtidos, o método proposto demonstrou ser simples, com boa eficiência de extração (70 - 90%) e frequência analítica nas concentrações utilizadas, pequena quantidade de amostra é necessária para as determinações (3,0 mL), exigindo baixo consumo de solventes e um curto tempo para separação das fases. Os limites de quantificação se encontravam inferiores aos valores estabelecidos pela legislação em que foram comparados.

Após ser validado o método ELL-PIS foi aplicado em águas de rios da Zona da Mata mineira e em água de torneira, não sendo encontrado resíduos dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina nestas amostras. O método também foi aplicado em amostras de água de lavagem de frutas e hortaliças coletadas no comércio de Viçosa-MG, seguido de adaptação do método validado para análise dos mesmos agrotóxicos nos frutos *in natura* após serem lavados com água destilada. Foi detectado a presença de resíduos dos agrotóxicos em estudo nos extratos da água de lavagem dos frutos e também nos extratos dos frutos *in natura* com níveis acima do limite máximo permitido (LMR) pela legislação brasileira e uso de produtos não autorizado para as determinadas culturas.

Desta forma, podemos concluir que a higienização convencional de frutas e hortaliças com água, não remove totalmente os resíduos dos agrotóxicos presentes nestes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEAS (Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior). **Proteção de plantas, módulo 4: controle de pragas agrícolas**. Viçosa: UFV, CCA, Departamento de Fitopatologia, 2003. 60p.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Rev Saúde Pública, 40 (2): 361-363**, 2006.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução nº 899, de 29/05/2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Brasília, 2003.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Monografias de Produtos Agrotóxicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/c20.pdf>. Acesso em: 18 de novembro de 2009.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Nota Técnica de Esclarecimento sobre o Risco de Consumo de Frutas e Hortaliças Cultivadas com Agrotóxicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/index.htm>. Acesso em: 14 de novembro de 2009.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008. Brasília, 15 de abril de 2009. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/resultados PARA 2008.pdf>. Acesso em 04 de novembro de 2009.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Agrotóxicos: Agência discute o controle de resíduos no Senado. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/index.htm>. Acesso em: 13 de janeiro de 2010.

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, 86(2): 412-431**, 2003.

ANTUNES-KENYON, S.E.; KENNEDY, G. **Thiamethoxam: a new active ingredient review**. Boston: Massachusetts Pesticides Bureau, Department of Food Agriculture, 37 p. 2001.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2.ed. São Paulo: Bookman, 622 p. 2002.

BITTENCOURT, L. M. **Dissipação e monitoramento dos inseticidas clorpirifós e thiamethoxam em tubérculos e solo cultivado com batata (*Solanum tuberosum*)**

L.), 2008. 81f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

BORTOLUZZI, E. C.; RHEINHEIMER, D. S.; GONÇALVES, C. S.; PELLEGRINI, J. B. R.; MARONEZE, A. M.; KURZ, M. H. S.; BACAR, N. M.; ZANELLA, R. Investigation of the occurrence of pesticide residues in rural wells and surface water following application to tobacco. **Química Nova**, **30 (8)**: 1872-1876, 2007.

BOCHNER, R. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas – SINITOX e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, **12(1)**: 73-89, 2007.

BOUWMAN, H.; SEREDA, B.; MEINHARDT, H.M. Simultaneous presence of DDT and pyrethroid residues in human breast milk from a malaria endemic area in South Africa. **Environmental Pollution**, **144**: 902 – 917, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Disponível em: [http://www.engetecno.com.br/legislacao/geral\\_pcnr.htm](http://www.engetecno.com.br/legislacao/geral_pcnr.htm) acessado em 01/09/2008. Acesso em: 20 de novembro de 2009.

BRASIL. Lei nº 9.974, de 06 de junho de 2000. Altera a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a exportação, o destino final dos resíduos, o controle, a inspeção e a fiscalização e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DOFC 07/06/2000, pag. 000001, col. 1.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a exportação, o destino final dos resíduos, o controle, a inspeção e a fiscalização e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DOFC 08/01/2002, pág. 000001, col. 2.

BRASIL. **Resolução do CONAMA no. 357, de 17 de março de 2005**. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Brasília. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no 19, de 03 de fevereiro de 2005. Cria a Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica - RENACIAT. **Diário Oficial da União**, 2005.

BRADBERRY, S.M., CAGE, S.A., PROUDFOOT, A.T., VALE, J.A., ALLISTER, J. Poisoning due to Pyrethroids. **Toxicological Reviews**, **24 (2)**: 93-106, 2005.

CABRERA, L., COSTA, F. P., PRIMEL, E. G. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do estado do RS. **Química Nova**, **31 (8)**: 1982-1986, 2008.

CAMILLERI, P. Alkaline hydrolysis of some pyrethroid insecticides. **Journal of agriculture and food Chemistry**, **32**: 1122-1124 (1984).

CARASEK, E. R. **Desenvolvimento de Métodos de Preparação de Amostras de Pesticidas Organoclorados e Compostos Orgânicos Voláteis, em uma Única Etapa, para Análise de Água por Cromatografia Gasosa**. Campinas: UNICAMP,

1997. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1997.

CASTRO, N. R. A.; RIGITANO, R. L. O.; LIMA, J. M.; GUERREIRO, M. C. Lixiviação do inseticida thiamethoxam em macrolisímetros de duas classes de solo **Ciência e agrotecnologia**, **32 (6)**: 1818-1823, 2008.

CE (1998) - Directiva 98/83/CE do Conselho, de 3 de Novembro de 1998, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. *J. Ofic. nº L 330 de 05/12/1998*: 32-54.

CEE (1980) - Directiva 80/778/CEE do Conselho, de 15 de Julho de 1980, relativa à qualidade das águas destinadas ao consumo humano. *J. Ofic. nº L 229 de 30/08/1980*: 11-29.

CENGIZ, M. F., CERTEL, M., KARAKAS, B., GOCMEN, H. Residue contents of DDVP (Dichlorvos) and diazinon applied on cucumbers grown in greenhouses and their reduction by duration of a pre-harvest interval and post-harvest culinary applications. **Food Chemistry**, **98**: 127–135, 2006.

CENGIZ, M. F., CERTEL, M., KARAKAS, B., GOCMEN, H. Residue contents of captan and procymidone applied on tomatoes grown in greenhouses and their reduction by duration of a pre-harvest interval and post-harvest culinary applications. **Food Chemistry**, **100**: 1611–1619, 2007.

CEREJEIRA, M. J.; VIANA, P.; BATISTA, S.; PEREIRA, T.; SILVA, E.; VALÉRIO, M. J.; SILVA, A.; FERREIRA, M.; SILVA-FERNANDES, A. M.; Pesticides in Portuguese surface and ground waters. **Water Research**, **37**: 1055-1063, 2003.

CHAUHAN, L. K., PAUL, B. N.; GOEL, S. K.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or isoprotruron on human peripheral lymphocytes and mouse bone marrow cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, **48 (8)**: 636-646, 2007.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, Vol. **31(3)**: 623-636, 2008.

CHRISTENSEN, H. B.; GRANBY, K.; RABELLE, M. Processing factors and variability of pyrimethanil, fenhexamida and tolylfluanid in strawberries. **Food Additives and Contaminants A**, **20 (8)**: 728-741, 2003.

CNUMAD - Conferencia das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento: **Agenda 21**. Capítulo 18. Senado Federal, Brasília, 585 p. 1992.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. e BONATO, P. S. **Introdução a métodos Cromatográficos**, editora Unicamp, Campinas, São Paulo, 279p, 1990.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. e BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**, editora Unicamp, Camoinas, São Paulo, 290p, 2006.

CONTE, M. L., LEOPOLDO, P. R., BREDÁ, P. C. **Avaliação das concentrações de defensivos agrícolas nas águas da Bacia Experimental Do Rio Pardo - Região de Botucatu, Estado de São Paulo – BRASIL**. XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2000. Disponível em:

<http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/caliagua/v-035.pdf>. Acesso em: 15 de novembro de 2009.

COUNCIL DIRECTIVE. *Quality of water intend for human consumption*. Jornal Oficial das Comunidades Europeias, 1998. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:EN:PDF>. Acesso em: 10 de novembro de 2009.

COSTA, L. M.; KORN, M. G. A.; CASTRO, J. T.; SANTOS, W. P. C.; CARVALHO, E. V.; NOGUEIRA, A. R. A. Planejamento fatorial aplicado a digestão de amostras de feijão assistida por radiação microondas. **Química Nova**, **29 (1)**: 149-152, 2006.

CUADROS-RODRIGUEZ, L.; GARCÍA-CAMPANA, A. M.; ALMANSA-LÓPEZ, E.; EGEA-GONZÁLES, F. J.; CANO, M. L. C.; FRENICH, A. G.; MARÍNEZ-VIDAL, J. L.. Correction function on biased results due to matrix effects application to the routine analysis of pesticide residues. **Analytica Chimica Acta**, **478 (2)**: 281-311, 2003.

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

DIEZ, C.; TRAAG, W. A.; ZOMMER, P.; MARINERO, P.; ATIENZA, J.; Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. **Journal Chromatography A** 1131(1-2):11-23. 2006.

DONG, H. P.; CHUN, C. L.; MING-LING, W.; JOU-FANG, D.; CHEN-CHANG, Y. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Clinical Toxicology** **47**: 336-341, 2009.

DORES, E.F.G.C. **Contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas em Primavera do Leste, Mato Grosso**. 2004, 282f. Dissertação (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 2004.

EPA (Environmentl Protection Agency). 2009. Pesticides: Registration Review Thiamethoxam. Disponível em: [http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration review/highlights.htm](http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration%20review/highlights.htm). Acesso em 5 de janeiro de 2010.

EIRAS, S. P.; ANDRADE, J. C. O uso do simplex modificado como estratégia de otimização em química analítica. **Química Nova**, **19 (1)**: 24-29, 1996.

ERNEY, D. R.; GILLESPIE, A. M.; GILVYDIS, D. M. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, **638**: 57- 63, 1993.

FARIA, A.M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A. Extração por ponto nuvem: técnica alternativa para a extração de resíduos de agrotóxicos. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, **(15)**: 29-42, 2005.

FERNANDES, D. R. **Estudo da determinação eletroquímica do enxofre elementar em gasolina**. 2004. 165f. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2004.

- FERNANDES NETO, M. L.;SARCIENELLI, P. N. Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição o processo de atualização da legislação brasileira. **Engenharia Sanitária Ambiental**, **14(1)**: 69-78, 2009.
- FILIZOLA, H. F., FERRACINI, V. L., SANS, L. M., GOMES, M. A. F., FERREIRA C. J. A. Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guairá. **Pesquisa agropecuária brasileira**, **37(5)**: 659-667, 2002.
- FRANCO, A. A. **Resíduos de deltametrina, aplicada em diferentes formulações, em compartimentos da cultura do pepino (*Cucumis sativus* L.) tutorado e ação do inseticida no controle da broca-das-cucurbitáceas *Diaphania nitidalis* (CRAMER,1782) (*Lepidóptera:crambidae*)**. 2004. 111f. Dissertação (Doutorado na Entomologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2004.
- FYTIANOS, K.; RAIKOS, N.; THEODORIDIS, G.; VELINOVA, Z.; TSOUKALI, H. Solid phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in fruits, **Chemosphere**, **65**: 2090-2095, 2006.
- GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B., MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, **29 (1)**: 105-112, 2006.
- GARRIDO FRENICH, A. et al. Determination of multiclass pesticides in food commodities by pressurized liquid extraction using GC-MS/MS and LC-MS/MS. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, **383**: 1106-1118, 2005.
- GAO, J., LIU, L., LIU, X., ZHOU, H., LU, J., HUANG, S., WANG, Z., The Occurrence and Spatial Distribution of Organophosphorous Pesticides in Chinese Surface Water . **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, **82 (2)**: 223-229, 2009.
- GBLER, L.; Banco de Informações Ambientais e Toxicológicas dos Agrotóxicos Utilizados até a Safra 2002/2003 na Produção Integrada de Maçãs no Brasil. Embrapa Uva e Vinho: Bento Gonçalves, RS, **Circulação Técnica**, **48**, 2004.
- GOMES, M.A.F.; SPADOTTO, C.A.; LANCHOTTE, V.L. Ocorrência do herbicida Tebuthiuron na água subterrânea da microbacia do Córrego Espreado, Ribeirão Preto, SP. **Pesticidas: Riscos Ecotoxicológicos e Meio Ambiente**, **Curitiba**, **11**: 65-76, 2001.
- GONÇALVES, C.; ALPENDURADA, M. F. Multiresidue Method for the Simultaneous Determination of Four Groups of Pesticides in Ground and Drinking Waters, using Solid-Phase Microextraction-gas Chromatography with Electron-capture and Thermionic Specific Detection. **Journal of Chromatography A**, **968**: 177-190, 2002.
- GORENSTEIN, O. Monitoramento de resíduos de agrotóxicos em frutas e hortaliças frescas comercializadas na CEAGESP: análise de resultados de 2003. **Informações Econômicas**, **34 (10)**: 34-42, 2004.
- GOULART, S. M. **Extração de deltametrina e cipermetrina de leite e análise por cromatografia gasosa**. 2003. 60f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2004.
- GRISOLIA, C.K. **Agrotóxicos: mutações, reprodução e câncer**. UnB: Brasília, 392p.

2005.

GRÜTZMACHER, D.D.; GRÜTZMACHER, A.D.; AGOSTINETTO, D.LOECK, A.E.; ROMAN, R.; PEIXOTO, S.C.; ZANELLA, R. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, **12 (6)**: 632- 637, 2008.

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

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

HEALTH CANADA. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality-Chemical/Physical Parameters. Disponível em: [http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/sum\\_guide-res\\_recom/chemical- chimiques-eng.php](http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/sum_guide-res_recom/chemical- chimiques-eng.php). Acesso em: 22 de outubro de 2009.

HELLER, L.; BASTOS, R.K.X.; PINTO, V.G.; PADUA, V.L. *Terceira edição do guias da Organização Mundial da Saúde: que impacto esperar na Portaria nº 518/2004?* In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23, 2005, Campo Grande, MS. **Anais...**Rio de Janeiro: ABES, 2005. (CD-ROM).

HERNANDEZ-BORGES, J.; BORGES-MIQUEL, T. M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A.; CIFUENTES, A. Cifuentes "Sample treatments prior to capillary electrophoresis-mass spectrometry". **Jornal of Chromatography A**, **1153**: 214 – 226, 2007.

HERCEGOVÁ, A.; DOMOTOROVÁ, M.; MATISOVÁ, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **Jornal of Chromatography A**, **1153 (1-2)**: 54-73, 2007.

HIEMSTRA, M.; KOK, A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Jornal of Chromatography A**, **1154 (1-2)**: 3-25, 2007.

HUMBERT, S., MARGNI, M.; CHARLES, R.; SALAZAR, O.M.T.; QUIRÓS, A.L.; JOLLIET, O. Toxicity assessment of the main pesticides used in Costa Rica. **Agriculture, Ecosystems and Environment** **118 (1-4)**: 183-190, 2007.

IMA (Instituto Mineiro Agropecuário). Fiscalização apreende 1 milhão de quilos de agrotóxicos na Syngenta. Disponível em: [http://www.ima.mg.gov.br/index.php?option=com\\_content&task=view&id=799&Itemid=276](http://www.ima.mg.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=799&Itemid=276). Acesso em: 10 de dezembro de 2009.

IBGE; Indicadores de desenvolvimento sustentável, Brasil, 2008, Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=1156&id\\_pagina=1](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1156&id_pagina=1). Acesso em: 10 de dezembro de 2009.

ICH; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, 2QB (CPMP/ICH/281/95), 1996.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. (2007). **DOQ – CGCRE – 008**. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão 02, Junho.

JARDIM, I. C.S. F.; ANDRADE, J. A.; QUEIROZ, S. C. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Química Nova**, **32 (4)**: 996-1012, 2009.

JURASKE, R.; ANTÓN, A.; CASTELLS, F.; HUIJBREGTS, M.A.J. Human intake fractions of pesticides via greenhouse tomato consumption: comparing model estimates with measurements for Captan. **Chemosphere**, **67 (6)**: 1102–1107, 2007.

JURASKE, R.; ANTÓN, A.; CASTELLS, F. Estimating half-lives of pesticides in/on vegetation for use in multimedia fate and exposure models. **Chemosphere**, **70 (10)**: 1748–1755, 2008.

KAUSHIK, G.; SATYA, S.; NAIK, S.N. Food processing a tool to pesticide residue dissipation – A review. **Food Research International**, **42**: 26–40, 2009.

KIM, S.S.; LEE, R.D.; LIM, K.J.; KWACK, S.J.; RHEE, G.S.; SEOK, J.H.; LEE, G.S.; AN, B.S.; JEUNG, E.B.; PARK, K.L. Potential estrogenic and antiandrogenic effects of permethrin in rats. **Journal of Reproduction and Development**. **51(2)**: 201–210, 2005.

KONSTANTINOOU, I.K; HELA, D.G; ALBANIS, T.A. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. **Environmental Pollution** **141**: 555-570, 2006.

KRIJGSMAN, W.; VAN DE KAMP, C. G. Analysis of organophosphorus pesticides by capillary gas chromatography with flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, **117(1)**: 201- 205, 1976.

KRISTENSSON, E. M.; **Miniaturised extraction methods for gas chromatography analysis of environmental and biotic samples** 2005. 192 f. Tese de doutorado (Doutorado em Química) UVA, Amsterdam.

KROL, W.J.; ARSENAULT, T.L.; PYLYPIW, M.H.M.; MATTINA, M.J.I. Reduction of pesticide residues on produce by rinsing. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, **48 (10)**: 4666-4670, 2000.

KUSTER, M., ALDA, M. L.; BARCELÓ, D. Analysis of in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques, **Mass Spectrometry Reviews**, **25**: 900-916, 2006.

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

LAL, A. K.; DIKSHIT, A. K. The protection of chickpea (*Cicer arietinum* L.) during storage using deltamethrin on sacks. **Pesticide Research Journal**, **13 (1)**: 27–31, 2001.

LASKOWSKI, D. A. Physical and chemical properties of pyrethroids. **Reviews of Environmental Contamination Toxicology**, **174**: 49-170, 2002.

LEE, S. R.; MOURER, C. R.; SHIBAMOTO, T. Analysis before and after cooking processes of a trace chlorpyrifos spiked in polished rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **39 (5)**: 906–908, 1991.

LEE, S., GAN, J., KABASHIMA, J. Recovery of synthetic pyrethroids in water samples during storage and extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **50**: 7194-7198, 2002.

LEHOTAY, S.J. Supercritical fluid extraction of pesticides in foods, **Journal of chromatography A**, **785**: 289-312, 1997.

LEHOTAY, S.J., A.R. LIGHTFIELD, J.A. HARMAN-FETCHO AND D.J. DONOGHUE. Analysis of pesticide residues in eggs by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **49**: 4589-4596, 2001.

LEVIGARD, Y. E. **A interpretação dos profissionais de saúde acerca das queixas do nervoso no meio rural: uma aproximação ao problema das intoxicações por agrotóxicos**. 2001. 90f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), ENSP/FIOCRUZ. Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro.

LIU, W.; HU, Y.; ZHAO, J.; XU, Y.; GUAN, Y. Determination of organophosphorus pesticides in cucumber and potato by stir bar sorptive extraction. **Journal of Chromatography A**, **1095**: 1-7, 2005.

LUKE, M.; FROBERG, J. E.; MASUMOTO, H. T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, **58**: 1020- 1026, 1975.

MACIEL, E. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de para multirresíduos quantificação de resíduos de pesticidas em manga (*Mangifera indica*)**. 2005. 70f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistema). Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2005.

MAIENFISCH, P.; ANGST, M.; BRANDL, F.; FISCHER, W.; HOFER, D.; KAYSER, H.; KOBEL, W.; RINDLISBACHER, A.; SENN, R.; STEINEMANN, A.; WIDMER, H. Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. **Pest Management Science**, **57**: 906-913, 2001.

MAJORES, R. E. Salting-out Liquid-Liquid Extraction (SALLE). Disponível em: <http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=61359> Q. Acesso em 15 de novembro de 2009.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticides residues. **Journal of Chromatography A**, **1040**: 259-272, 2004.

MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S.J. Rapid sample preparation method for lc-ms/ms or gc-ms analysis for acrylamide in various food matrices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **54**: 7001-7008, 2006.

MENEGHINI, R. **Desenvolvimento de uma metodologia analítica com microextração líquido - líquido para determinação de agroquímicos organofosforados em água**. 2006. 90f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Regional de Blumenau, Blumenau-SC, 2006.

MENKISSOGLU-SPIROUDI, U.; FOTOPOULOU, A. Matrix effect in gás

chromatographic determination of insecticides and fungicides in vegetables. **International Journal Environmental Analytical Chemistry**, **84**: 15-27, 2004.

MONTEMURRO, N.; GRIECO, F.; LACERTOSA, G.; VISCONTI, A. Chlorpyrifos decline curves and residue levels from different commercial formulations applied to oranges. **Journal Agricultural Food Chemistry**, **50**: 5975-5980, 2002.

MORAGAS, W. M.; SCHNEIDER, M.O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos de Geografia**, 3 (10): 26-40, 2003.

National Registration Authority for agricultural and Veterinary Chemicals. **The NRA review of chlorpyrifos**; Volume 1, Camberra: NRA, 2002, 98p.

NAGOSA, Y.; TANIGUCHI, M.; MIURA, J. Hydrophobic salt-induced phase-separation and extraction for sample preparation in chromatographic determination of heavy metal ions as dibenzylidithiocarbamates, **Analytical Chemica Acta**, **356**: 135-140, 1997.

NASIRI, H.; FOROUZANDEH, M.; RASAEI, M. J.; RAHBARIZADEH, F.; Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent, **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, **19**: 229-232, 2005.

NASUTI, C.; CANTALAMESSA, F.; FALCIONI, G.; GABBIANELLI, R. Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. **Toxicology**, **191 (2-3)**: 233-244, 2003.

NAUEN, R.; EBBINGHAUS-KINTSCHER, U.; ELBERT, A.; JESCHKE, P.; TIETJEN, K. Acetylcholine receptors as sites for developing neonicotinoid insecticides. In: **Ishaaya, I., Biochemical sites important in insecticide action and resistance**, Springer Berlin, Germany, 77-105, 2001.

NETO, A. J. S.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Análise de agrotóxicos organofosforados em água por extração em fase sólida (SPE) utilizando discos C18 e cromatografia em fase gasosa: Avaliação da contaminação de reservatório de furnas (MG-Brasil). **Química Nova**, **28 (5)**: 747-750, 2005.

PAPADAKIS, E. N.; VRYZAS, Z.; PAPADOPOULAU – MOURKDOU, E. Rapid method for the determination organochlorine pesticides in sesame seeds by microwave – assisted extraction and analysis of extracts by gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, **1127**: 6-11, 2006.

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. **Quim. Nova**, **31 (5)**: 1190-1198, 2008.

PAWLISZYN, J. **Solid phase microextraction theory and practice**, Willey-VCH, Cambridge, 247 p. 1997.

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

PIHLSTRÖM, T.; BLOMKVIST, G.; FRIMAN, P.; PAGARD, U.; ÖSTERDAHL, B. G. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. **Analytical and Bionalytical Chemistry**, **389**: 1773-1789, 2007.

PINE, M. D., HINEY, J. K., LEE, B., DEES, W. L. The Pyrethroid Pesticide Esfenvalerate Suppresses the Afternoon Rise of Luteinizing Hormone and Delays Puberty in Female Rats. **Environmental Health Perspectives**, **116 (9)**: 1243-1247, 2008.

PINHO, G.P. **Extração de pesticidas em amostras de tomate pelas técnicas: extração sólido líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) e dispersão de matriz em fase sólida (DMFS) para análise por cromatografia gasosa**. 2007. 85f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

PINHO, G.P.. **Efeito de componentes da matriz na análise de agrotóxicos por cromatografia gasosa**. 2009. 120f. Dissertação (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008. Brasília, 15 de abril de 2009. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/DIVULGA/noticias/2009/pdf/150409\\_para.pdf](http://www.anvisa.gov.br/DIVULGA/noticias/2009/pdf/150409_para.pdf). Acesso em: 20 de dezembro de 2009.

PUSSENTE, C. I. **Extração sólido-líquido e partição em baixa temperatura (ESL-PBT) de clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina em maçã e análise por cromatografia gasosa**. 2008. 62f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

RACKE, K. D.; STEELE, K. P.; YODER, R. N.; DICK, W. A.; AVIDOV.E.; Factors affecting the hidrolic degradation of chlorpyrifos in soil. **Jounal Agricultural and food chemistry**, **44 (6)**: 1582- 1592, 1996.

RAWN, D. F. K.; QUADE, S. C.,; SUN, W.; FOUQUET, A.;BELANGER, A.; SMITH, M. Captan residue reduction in apples as a result of rinsing and peeling. **Food Chemistry**, **109**: 790–796, 2008.

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**, **27 (5)**: 771-780, 2004.

RIBANI, M.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B.G. Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. **Journal of Chromatography A**, **1156**: 201–205, 2007.

RIBEIRO, M. L.; LOURENCETTI, C.; PEREIRA, S. Y.; MARCHI, M. R. R. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. **Química Nova**, **30 (3)**: 688-694, 2007.

ROMERO-GONZALEZ, R.; PASTOR-MONTORO, E.; MARTÍNEZ-VIDAL, J. L. GARRIDO, F. A. Application of hollow fiber supported liquid membrane extraction to the simultaneous determination of pesticide residues in vegetables by liquid chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, **20**: 2701–2708, 2006.

- SABIK, H.; JEANNOT, R.; RONDEAU, B.; Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. **Journal Chromatography A**, **885**: 217 - 236, 2000.
- SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; ALBERO, B.; MARTÍN, G.; TADEO, J. L. Determination of pesticides residues by GC-MS using analyte protectants to counteract the matrix effect. **Analytical Sciences**, **21**: 1291-1296, 2005.
- SANCO, COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (2003). **Document nº SANCO/2007/3131**. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 3ª ed., Bruxelas, Bélgica. 31/10/2007.
- SANNINO A.; BOLZONI L.; BANDINI M. Application of liquid chromatography with electro spray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, **1036**:161-169, 2004.
- SANTOS, M.A.T.; AREAS, M.A.; REYES, F. G. R. Piretróides - uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, **18 (3)**: 339-349, 2007.
- SARCINELLI, P.N; PEREIRA, A.C.S; MESQUITA, A.S; OLIVEIRA-SILVA, J.J; MEYER, A; MENEZES, M.A.C; ALVES, S.R; MATTOS, R.C.O.C; MOREIRA, J.C; WOLFF, M Dietary and reproductive determinants of plasma organochlorine levels in pregnant women in Rio de Janeiro. **Environmental Research**, **9**: 143–150, 2003.
- SCHELLIN, M.; HAUSER, B.; POPP, P. Determination of Organophosphorus Pesticides using Membrane-assisted Solvent Extraction with Large Volume Injection – Gas Chromatography – Mas. Spectrometric Detection. **Journal of Chromatography A**, **1040**: 251 - 258, 2004.
- SCHENCK, F. J.; CALLERY, P.; GANNET, P. M.; DAFT, J. R.; LEHOTAY, S. J.; **Journal of AOAC International**, **85 (5)**: 1177-80, 2002.
- SCHWARTZ, B. J.; SPARROW, F. K.; HEART, N. E.; THEDE, B. M. Simultaneous Derivatization and Trapping of Volatile Products from Aqueous Photolysis of Thiamethoxam Insecticide. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, **48**: 4671-4675, 2000.
- SEQUINATTO, L.; REICHERT J. M.; REINERT, D. J.; RHEINHEIMER, D. S.; COPETTI, A. C. C. **Contaminação da água por agrotóxicos numa microbacia cultivada com fumo**. XVI Reunião Brasileira de Manejo e Conservação de Solo e Água, Aracaju, PE, 2006.
- SHAFFER, T. J.; MEYER D. A.; CROFTON, K. M. Developmental neurotoxicity of pyrethroids insecticides: critical review and future research needs. **Environmental Health Perspectives**, **113**: 123-136, 2005.
- SPADOTTO, C. A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. **Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**, São Manuel, 2006. Disponível em: [http://www.fmr.edu.br/npi\\_2.php](http://www.fmr.edu.br/npi_2.php). 9p. Acesso em 05 de jan 2010.
- SPENCER, C.; YUILL, K. H.; BORG, J. J.; HANCOX, J. C.; KOZLOWSKI, R. Z. Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 298(3), 1067-1082, 2001.

- SILVA, C.M.G. de S.; FAY, E.F. **Agrotóxicos e ambiente**. Jaguariúna: Embrapa Meio ambiente; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 400p, 2004.
- SILVA, E. P. **Validação de um método de extração e análise de multirresíduo de agrotóxicos em carne bovina por cromatografia gasosa**. 2008. 109 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2008.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Fundamental of Analytical Chemistry**, 5th., Saunders Golden Sunburst Series: Philadelphia, 1998.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J., J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**, John Wiley and Sons, New York, 110p, 1997.
- SOARES, W. L., PORTO, M. F. Atividade agrícola e externalidade ambiental: uma análise a partir do uso de agrotóxicos no cerrado brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, **12 (1)**: 131-143, 2007.
- ŠTAJNBAHER, D. & KRALJ, A. Z. Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, **1015**: 185-198, 2003.
- TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, **45**: 247-268, 2005.
- UMBELINO, C. O perigo dos agrotóxicos. Disponível em: [http://www.jornalcontexto.net/admin/images/21768300\\_1242996600.pdf](http://www.jornalcontexto.net/admin/images/21768300_1242996600.pdf). Acesso em: 28 de novembro de 2009.
- USDA - United States Department of Agriculture. Food and nutrition. Disponível em: [www.usda.gov](http://www.usda.gov). Acesso em 15 de março de 2009.
- URZEDO, A. P. F. M.; RIGITANO, R. L. O.; GUERREIRO, M. C.; CASTRO, N. R. A. Disipação do inseticida tiametoxam. **Pesticidas: Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, **16**: 31-38, 2006.
- VAN DER HOFF, G. R.; VAN ZONEN, P.; Trace analysis of pesticide by gas chromatography, **Journal of Chromatography A**, **843**: 301-322, 1999.
- VEIGA, M. M., SILVA, D. M., VEIGA, L. B. E., FARIA, M. V. C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, **22 (11)**: 2391- 2399, 2006.
- VIEIRA, H. P. **Otimização e validação da extração simultânea de piretróides em água e solo e análise por cromatografia gasosa**. 2005. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2005.
- 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**, **30 (3)**: 535-540, 2007.
- VIRAN, R.; ERKOÇ, F.V.; POLAT, H.; KOÇAT, O. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicology and Environmental Saety**, **55**: 82-85, 2003.

WALLS, D.; SMITH, P. G.; MANSELL, M. G. Pesticides in groundwater in Britain. **International Journal of Environmental Health Research**, 6: 55-62, 1996.

WHO (World Health Organization). Environmental Health Criteria. Cypermethrin. Who Technical Report Series, N. 82, (1989). Disponível em :<<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc82.htm>> Acesso em: 19 de novembro de 2009.

WHO (World Health Organization). Environmental Health Criteria. Deltamethrin. Who Technical Report Series, N. 97, (1990). Disponível em :<<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc97.htm>> Acesso em: 19 de novembro de 2009.

WHO (World Health Organization). Public used in agriculture. Genebra: WHO, 1990. 128p.

WHO (World Health Organization). **International Programme on Chemical Safety. Guidelines for drinking – water quality**, WHO, Geneva, vol. 2, 973 p. 1996.

WHO (World Health Organization). 2003. Regional per Capita Consumption of Raw and Semi-Processed Agricultural Commodities. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/gemsdiet.pdf>. Acesso em: 10 de janeiro de 2010.

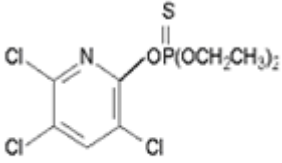
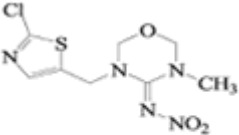
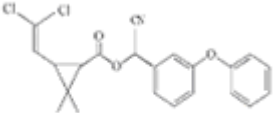
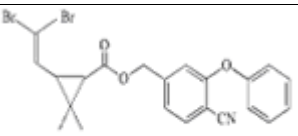
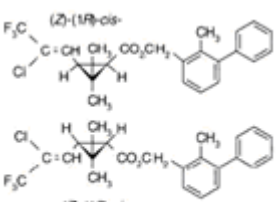
WHO (World Health Organization).. Guidelines for drinking - water quality. Third Edition. 1st Addendum to vol. 1. Geneva: WHO, 2006. Disponível em [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq0506.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq0506.pdf). Acesso em 22 outubro de 2009.

WHO (World Health Organization). PESTICIDES - Children's Health and the Environment. Training Package for the Health Sector World Health Organization, (2008) Disponível em: <http://www.who.int/ceh/capacity/Pesticides.pdf>. Acesso em 03 de novembro de 2009.

ZHANG, L.J. ; WU, H.; KIM, E.; EL-SHOUBAGY, T.A. Salting-out assisted liquid/liquid extraction with acetonitrile: a new high throughput sample preparation technique for good laboratory practice bioanalysis using liquid chromatography–mass spectrometry. **Biomed. Chromatogr.** 23: 419–425 (2009).

## ANEXO

**Tabela 2.7** – Características dos agrotóxicos clorpirifós, tiametoxam, cipermetrina e deltametrina

Ingrediente ativo	Classificação toxicológica	Fórmula estrutural e molecular	Grupo químico	Classe/modo de ação nas plantas	Aplicação nas matrizes estudadas
Clorpirifós	Classe II Altamente tóxico	 $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	organofosforado	Inseticida, formicida, acaricida de contato	(Foliar) maçã e tomate
Tiametoxam	Classe III Medianamente tóxico	 $C_8H_{10}ClN_5O_3S$	neonicotinóide	Inseticida sistêmico	(Foliar) Tomate e morango (solo) Maçã, tomate e pimentão
Cipermetrina	Classe II Altamente tóxico	 $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$	Piretróide	Inseticida e formicida de contato	(foliar) tomate
Deltametrina	Classe III Medianamente tóxico	 $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	Piretróide	Inseticida e formicida de contato	(foliar) Maçã, pimentão e tomate
Bifentrina	Classe II Altamente tóxico	 $C_{23}H_{22}ClF_3O_2$	Piretróide	Inseticida, formicida, acaricida de contato	(Foliar) tomate

Fonte: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/c20.pdf>