

**RAQUEL PELLANDA DARDENGO**

**ANÁLISE MULTIRRESÍDUO DE INSETICIDAS EM BATATA**  
**(*Solanum tuberosum L.*)**

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  
2007

**RAQUEL PELLANDA DARDENGO**

**ANÁLISE MULTIRRESÍDUO DE INSETICIDAS EM BATATA**  
**(*Solanum tuberosum L.*)**

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: 28 de fevereiro de 2007.

---

Prof. Antônio Augusto Neves  
(Co-Orientador)

---

Prof. Laércio Zambolim

---

Prof. César Reis

---

Prof. Isabel Cristina S. F. Jardim

---

Profa. Maria Eliana L. R. de Queiroz  
(Orientadora)

*À Deus,  
Aos meus pais Celso e Arlinda,  
Ao meu irmão Victor,  
Ao Junior,*

*Pelo fato de nunca medirem esforços para satisfazerem os meus ideais...*

*Com amor,  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Expresso meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram com a realização do presente estudo.

Em especial, aos professores, Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e Antônio Augusto Neves, pela oportunidade, confiança, incentivo, ensinamentos transmitidos, pela dedicada orientação e, sobretudo, pela eterna amizade.

Ao professor Laércio Zambolim pelas valiosas sugestões e pelo apoio, disponibilizando as amostras de batatas.

Ao professor Cláudio Ferreira Lima, ao professor José Humberto de Queiroz e à Elizete pela amizade.

Aos professores César Reis e Isabel Cristina Sales Fontes Jardim pela participação na banca examinadora e pelas sugestões para melhoria do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Viçosa, particularmente ao Departamento de Química, que contribuiu para a realização deste trabalho.

A todos os amigos do laboratório de química analítica – LAQUA: Deyse, Elisa, Gevany, Jacqueline, Jussara, Leila, Lucimara, Marciano, Ricardo e Rodrigo, pelo auxílio, amizade e agradável convívio.

Aos inesquecíveis ex-LAQUA: Anízio, Fabricía, Heula, Patrícia, Simone e Telma, por todos os incentivos.

## **BIOGRAFIA**

RAQUEL PELLANDA DARDENGO, filha de Celso Ademir Dardengo e Arlinda Pelanda Dardengo, nasceu em Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, em 02 de Janeiro de 1983.

Em março de 2001, iniciou o Curso de Graduação em Química, pela Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se como bacharel e licenciada em janeiro de 2005.

Em março de 2005, iniciou o curso de pós-graduação em Agroquímica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2007.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. O uso de agrotóxicos .....	1
1.2. Agrotóxicos e os alimentos .....	3
1.3. A bataticultura e os agrotóxicos .....	5
1.4. Metodologias de análise .....	8
1.5. Métodos multirresíduos para análise de agrotóxicos em alimentos .....	10
1.6. Efeito da matriz nos métodos multirresíduos .....	13
1.7. Objetivos desse trabalho .....	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	17
2.1. Preparo de soluções padrão .....	17
2.2. Amostras de batata .....	17
2.2.1. Fortificação das amostras de batata .....	18
2.3. Otimização da técnica de extração ESL-PBT .....	19
2.3.1. Extração dos inseticidas em batata .....	19
2.3.1.1. Planejamento experimental para escolha da mistura extratora .....	20
2.3.1.2. Avaliação da força iônica na eficiência da extração .....	22
2.3.1.3. Deslocamento no planejamento da mistura extratora .....	23
2.3.1.4. Efeito da vibração ultra-sônica .....	24
2.3.1.5. Avaliação do tipo de congelamento .....	24
2.3.1.6. Avaliação da mistura extratora água/acetonitrila/metanol .....	25
2.3.1.7. Avaliação do tempo de extração .....	25
2.3.1.8. Avaliação do tempo de fortificação .....	26
2.3.1.9. Planejamento fatorial .....	26
2.4. Análise cromatográfica .....	27
2.4.1. Quantificação .....	28
2.5. Validação do método analítico .....	29
2.5.1. Seletividade .....	30
2.5.2. Linearidade de resposta do detector .....	30
2.5.3. Limite de detecção e limite de quantificação do CG-DCE .....	30
2.5.4. Precisão .....	31
2.5.4.1. Repetitividade .....	31
2.5.4.2. Precisão intermediária .....	31
2.5.5. Exatidão .....	32
2.5.5.1. Ensaio de recuperação .....	32
2.5.5.2. Comparação de métodos .....	33
2.5.6. Robustez .....	33
2.6. Efeito da matriz no método multirresíduo ESL-PBT .....	34
2.6.1. Avaliação do efeito da matriz na análise cromatográfica em diferentes	

tipos de batata .....	34
2.6.2. Avaliação do efeito da matriz na análise cromatográfica em função do tempo e da forma de armazenamento de batatas e dos extratos .....	35
2.7. Aplicação da metodologia otimizada em amostras de batata da região Sul do estado de Minas Gerais e do comércio de Viçosa-MG .....	36
2.7.1. Aplicação da metodologia otimizada em partes isoladas da batata ..	36
2.7.2. Comportamento dos resíduos de clorpirifós em batata após cozimento.....	37
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
3.1. Caracterização das amostras de batata .....	38
3.2. Análise cromatográfica.....	38
3.2.1. Curvas analíticas e linearidade de resposta do detector.....	40
3.3. Otimização do método ESL-PBT .....	42
3.3.1. Planejamento experimental para escolha da mistura extratora .....	43
3.3.2. Avaliação da força iônica na eficiência da extração.....	50
3.3.3. Deslocamento no planejamento da mistura extratora .....	53
3.3.4. Efeito da vibração ultra-sônica .....	58
3.3.5. Avaliação do tipo de congelamento .....	61
3.3.6. Avaliação da mistura extratora água/acetonitrila/metanol.....	62
3.3.7. Avaliação do tempo de extração .....	65
3.3.8. Avaliação do tempo de fortificação .....	66
3.3.9. Planejamento fatorial .....	68
3.4. Metodologia otimizada .....	72
3.5. Validação da metodologia analítica .....	74
3.5.1. Conceitos de validação .....	74
3.5.2. Seletividade .....	74
3.5.3. Limite de detecção e limite de quantificação do CG-DCE.....	75
3.5.4. Precisão .....	78
3.5.4.1. Repetitividade .....	78
3.5.4.2. Precisão intermediária .....	79
3.5.5. Exatidão .....	80
3.5.5.1. Ensaio de recuperação .....	80
3.5.5.2. Comparação de métodos.....	82
3.5.5. Robustez.....	83
3.6. Efeito da matriz no método multirresíduo.....	84
3.6.1. Avaliação do efeito da matriz na análise cromatográfica em diferentes tipos de batata .....	88
3.6.2. Avaliação do efeito da matriz na análise cromatográfica em função do tempo e da forma de armazenamento de batatas e de extratos.....	89
3.7. Aplicação da metodologia ESL-PBT em amostras de batata da região Sul do estado de Minas Gerais e do comércio de Viçosa-MG .....	92
3.7.1. Aplicação da metodologia ESL-PBT em partes isoladas da batata ..	94
3.7.2. Comportamento dos resíduos de clorpirifós em batata após cozimento.....	95
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>96</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>98</b>

## RESUMO

DARDENGO, Raquel Pellanda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2007. **Análise multirresíduo de inseticidas em batata (*Solanum tuberosum* L.)**. Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-Orientadores: Antônio Augusto Neves e Antônio Alberto da Silva.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar a técnica extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) para análise de resíduos dos inseticidas clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em batata. Na etapa de otimização, foi realizada a extração dos agrotóxicos de interesse de amostras de batata fortificadas, com misturas extratoras (água, acetonitrila e acetato de etila) determinadas através de um planejamento experimental, tendo como resposta a eficiência na extração dos inseticidas. As amostras de batata com as misturas extratoras, em fase única, foram agitadas e deixadas em freezer por aproximadamente 12 horas. Depois de separadas as fases pelo congelamento da fase aquosa, com o abaixamento de temperatura, a fase superior ainda líquida foi separada e submetida à análise por cromatografia gasosa usando detector por captura de elétrons e bifentrina como padrão interno. Ainda na etapa de otimização do método foram avaliadas algumas variáveis no processo de extração dos agrotóxicos de batata como: força iônica, uso do ultra-som, tipo de congelamento, mistura extratora contendo metanol, tempo de extração e de fortificação. O método otimizado consiste em acrescentar em 3,000 g de batata triturada 1,0 mL de água, 6,5 mL de acetonitrila, 2,5 mL de acetato de etila e submeter a mistura à sonicação por 10 minutos seguida de congelamento. A fase orgânica líquida no sobrenadante é passada por um papel de filtro com sulfato de sódio anidro. O método otimizado foi validado determinando-se a seletividade, faixa de linearidade, limites detecção e quantificação, precisão e exatidão. Os resultados obtidos

mostraram que o método desenvolvido constituído de ESL-PBT seguido de análise cromatográfica é eficiente para análise de resíduos dos inseticidas normalmente aplicados em batata, mostrando porcentagens de recuperação maiores que 80 % e limites de detecção abaixo dos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos para estes agrotóxicos neste tipo de alimento. Além disso, a metodologia apresenta um pequeno consumo de solvente (10,0 mL) e ausência de etapas de purificação dos extratos antes da análise cromatográfica. O efeito da matriz mostrou-se presente na quantificação dos agrotóxicos por cromatografia gasosa. Para contornar esse efeito curvas analíticas foram preparadas em extratos orgânicos, obtidos da extração de batatas não contaminadas. Nessas condições foram obtidas porcentagens de recuperação acima de 70 % para todos os inseticidas. Este efeito da matriz diminui significativamente durante o processo de estocagem dos extratos, mesmo em baixa temperatura. O método otimizado e validado foi aplicado em amostras de batata adquiridas de bataticultores da Região Sul do estado de Minas Gerais e no comércio da cidade de Viçosa-MG. Foi detectada a presença de resíduos de clorpirifós abaixo do LMR estabelecido, em batatas cultivadas pelo modo convencional. Observou-se que a retenção dos resíduos ocorre na casca das batatas e que estes não são eliminados mesmo após o cozimento das mesmas.

## ABSTRACT

DARDENGO, Raquel Pellanda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2007. **Analysis multiresidue of insecticides in potato (*Solanum tuberosum L.*)**. Adviser: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-Advisers: Antônio Augusto Neves and Antônio Alberto da Silva.

The objective of this project was to develop and valid the solid-liquid extraction methodology and purification in low temperature (ESL-PBT) to the residues analysis of the insecticides, chlorpyrifos,  $\lambda$ -cyhalothrin, cypermethrin and deltamethrin in potatoes. On the optimization stage, the agrotoxics' extraction of interests of samples of fortified potatoes was made with extractor mixtures (water, acetonitrile and ethyl acetate) determined through an experimental planning, obtaining as answer the efficiency on the insecticides extraction. The potato samples with the extractors mixtures, in unique phase, were shaken and put in a freezer for approximately 12 hours. After being separated in phases by the freezing of the watery phase, with the temperature reduction, the superior phase, still liquid, was separated and submitted to an analysis for gaseous chromatography using detector for electrons capture and biphenthrin as internal standard. On the method optimization stage, some variables were evaluated on the potato agrotoxics extraction process such as: ionic force, the usage of ultrasound, type of freezing, extractor mixture containing methanol, time extraction and fortification. The optimized method consists in adding in 3,000 g of triturated potato, 1,0 mL of water, 6,5 mL of acetonitrile, 2,5 mL of ethyl acetate and submit the mixture to the sonication for 10 minutes followed by freezing. The liquid organic phase on the supernatant passed through a paper of filter with sodium sulphate anhydrous. The optimized method was validated determining the selectivity, tax of linearity, limits detection and quantification, precision and accuracy. The obtained results showed that the developed method constituted of ESL-PBT followed by chromatographic

analysis is efficient to the insecticide residues analysis normally applied in potatoes, showing recuperation percentages higher than 80% and detection limits under the maximum limits of residues (LMR) established for these agrotoxics on this type of food. Besides, the methodology presents a small consume of solvents (10,0 mL) and lack of purification stages of the extracts before the chromatographic analysis. The matrix effect showed itself present on the quantification of the agrotoxics for gaseous chromatography. To get over this effect, analytic curves were prepared in organic extracts, obtained through the extraction of non-contaminated potatoes. In these conditions were obtained recuperation percentages over 70 % to all the insecticides. This matrix effect gets smaller, significantly, during the extracts storage process, although the low temperature. The optimized and validated method was applied in potatoes samples obtained from potato creators from the South Region in the state of Minas Gerais and in Viçosa's - MG market. It was detected the presence of chlorpyrifos residues under the established LMR in cultivated potatoes on the conventional way. It was observed that the residues retention occurs on the potato's rind and it's not eliminated even after their cooking.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. O uso de agrotóxicos

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

De um modo geral, os herbicidas são os mais utilizados no meio rural, seguido dos inseticidas e fungicidas. Os inseticidas englobam compostos bastante diferenciados quimicamente, que podem ser agrupados em quatro categorias principais: os organoclorados, os piretróides, os organofosforados e os carbamatos (SILVA et al., 2001).

Os organofosforados e os piretróides são amplamente usados em uma variedade de culturas, por demonstrarem alta eficácia e curta persistência no meio ambiente (LAMBROPOULOU & ALBANIS, 2002; OVIEDO et al., 2003; FARIA, 2003).

Os compostos pertencentes à classe dos organofosforados agem no sistema nervoso central do inseto, pela inibição das enzimas colinesterases, com conseqüente acúmulo de acetilcolina nas fibras nervosas, que impede a transmissão de novos impulsos gerando uma série de efeitos no organismo como convulsões, paradas respiratórias, coma e morte (SILVA et al., 1999; SILVA et al., 2001; COUTINHO et al., 2005).

De acordo com a publicação da Extension Toxicology Network (1996), os principais sintomas de intoxicação humana por organofosforados incluem sensações de formigamento, dor de cabeça, vertigem, tremor, náuseas,

câimbras abdominais e suores. Doses muito altas podem resultar em inconsciência e convulsões. Alguns organofosforados não produzem sintomas imediatos, podendo ser observadas alterações de 1 a 4 semanas após a exposição.

Os piretróides, como a deltametrina, cipermetrina e  $\lambda$ -cialotrina, sintetizados em 1974, 1977 e 1985, respectivamente, dentre outros piretróides sintéticos que foram desenvolvidos com sucesso (HIRATA, 1995) são inseticidas lipofílicos (ANGERER & RITTER, 1997), de ação rápida e amplo espectro de atividade (BARRIONUEVO & LANÇAS, 2001). Atuam no sistema nervoso através da retenção de cálcio livre nos canais de sódio das células, potencializando o grau de excitação das células nervosas e interrupção da transmissão do impulso nervoso, levando os organismos à paralisia e morte (ANGERER & RITTER, 1997; FAKATA et al., 1998).

No organismo humano, os piretróides podem ser absorvidos pelo trato gastrointestinal, pela pele, ou por via inalatória, sendo metabolizados no fígado através de reações de oxidação e hidrólise de ésteres. Seus metabólitos são excretados, lentamente, na urina, podendo permanecer detectável nos tecidos corporais por até 3 semanas após a ingestão (WHO, 1990).

A primeira ação dos piretróides no sistema nervoso humano é a indução de atividades repetitivas e duradouras, como tremores, salivação e hipersensibilidade. Esses efeitos são mais pronunciados pelos piretróides  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, que apresentam o grupo ciano na molécula (MIYAMOTO et al., 1995).

Estudos recentes evidenciaram disfunção auditiva em um grupo de 98 agricultores, com idade entre 15 e 59 anos, associada a exposições combinadas dos organofosforados e piretróides, pois os trabalhadores não haviam sido expostos a ruído (TEIXEIRA et al., 2003).

Inseticidas organofosforados e piretróides são frequentemente utilizados no controle de pragas de culturas como: algodão, batata, café, cebola, feijão, maçã, melancia, soja, sorgo, tomate e trigo (ANVISA, 2005a). Existem ainda produtos comerciais, tais como os empregados em campanhas de combate a vetores de doenças como dengue/febre amarela (TEIXEIRA et al., 2003) e *spray* de usos domésticos que utilizam organofosforados e piretróides. Além

disso, vários piretróides também são utilizados no controle de carrapatos em rebanhos.

Em razão da grande utilização desses inseticidas, pode-se observar na literatura várias publicações envolvendo o monitoramento de resíduos destes compostos em diversos compartimentos ambientais tais como: água (SILVA et al., 1999; BARRIONUEVO & LANÇAS, 2001), solo, (PERES et al., 2002; VIEIRA, 2005), fluidos biológicos como urina (ANGERER & RITTER, 1997) e alimentos (KAIPPER et al., 2001; LAMBOPOULOU & ALBANIS, 2002; OVIEDO et al., 2003; PENA et al., 2003a; LAMBOPOULOU & ALBANIS, 2003; DÓREA & LOPES, 2004; GOBO et al., 2004; GOULART, 2004; CARDOSO et al., 2004; SHULING et al., 2006).

Caso as aplicações de tais produtos fossem feitas de forma racionalizada, problemas relacionados à intoxicação de humanos, contaminações de alimentos, de água e de solos, aparecimento de espécies resistentes e danos em espécies não visadas poderiam ser significativamente reduzidos (QUEIROZ, 2001). Porém, o que se observa é que na tentativa de se garantir uma boa produtividade e de se controlar pragas, doenças e ervas invasoras, os agrotóxicos têm sido aplicados de forma indiscriminada devido às propagandas enganosas e às próprias características culturais do trabalhador rural, como falta de capacitação profissional e de assistência técnica (ARAÚJO et al., 2001).

## **1.2. Agrotóxicos e os alimentos**

A exposição aos agrotóxicos pode ser atribuída tanto ao consumo de alimentos contaminados, quanto ao contato direto no caso dos trabalhadores rurais e ou manipuladores, ou ainda ao contato indireto como no caso de populações que são atingidas por resíduos levados pela ação dos ventos durante a aplicação. Em função disso avaliar a qualidade dos alimentos que estão sendo consumidos pela população, caracterizar as possíveis fontes de contaminação, avaliar quanto ao uso inadequado e não autorizado de

agrotóxicos e estimular a adoção de Boas Práticas Agrícolas (BPA) nos mais diversos tipos de culturas desenvolvidas no país, têm se tornado imprescindível (ANVISA, 2005b).

Para controlar o uso inadequado de agrotóxicos e o nível de resíduos desses compostos nos alimentos, órgãos internacionais e nacionais estabelecem limites máximos de resíduos (LMR) permitidos para cada pesticida/cultura. Este é entendido como a concentração máxima de resíduos de agrotóxicos que pode estar presente nos alimentos consumidos pela população sem trazer prejuízos à saúde. No âmbito internacional, esses limites são estabelecidos pela Comissão do Codex Alimentarius, enquanto no âmbito nacional, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão regulador responsável pela avaliação toxicológica dos agrotóxicos (IMOTO, 2004).

Segundo a ANVISA (2005b), pode-se afirmar que é freqüente a identificação de resíduos de agrotóxicos nos alimentos e, em muitos casos, se detectam concentrações acima dos limites máximos de resíduos permitidos além dos não autorizados. Por isso, tem se tornado cada vez mais necessário controlar os resíduos de agrotóxicos que permanecem das aplicações nas mais diversas culturas. 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).

A presença de agrotóxicos acima dos limites permitidos para cada tipo de alimento ou em culturas não autorizadas, pode originar não somente problemas de saúde pública e de ordem ecológica, como também barreira comercial, tanto no mercado interno como no externo (OVIEDO et al., 2003). Por tudo isso, a preocupação com a contaminação de alimentos por resíduos de agrotóxicos tem aumentado no meio científico.

Em 2003, OVIEDO et al., analisaram hortaliças comercializadas nas Centrais de Abastecimento de Campinas, e evidenciaram o uso inadequado de piretróides, sendo detectados resíduos de permetrina acima do seu limite máximo em alface e tomate. Além disso, também foi constatado em tomate a presença de cipermetrina, embora o seu uso não seja autorizado para este tipo de cultura. Por outro lado, tomates do Sul do país foram analisados, por GOBO

et al. (2004), sendo detectada a presença de resíduos de inseticidas organofosforados, acefato e metamidofós.

Amostras de alface, batata, cenoura, tomate etc, de diversos estados brasileiros, também foram analisadas, entre 2001 e 2004, pelo Projeto de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) desenvolvido pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). Foram detectados resíduos de agrotóxicos em frutas e verduras, dentre eles, clorpirifós em batatas, nos três anos do programa (ANVISA, 2005b).

DÓREA & LOPES (2004), analisando resíduos de agrotóxicos organofosforados e piretróides em amostras de quiabos coletados na região de Aracaju-SE, determinaram cipermetrina e deltametrina, acima dos limites máximos de resíduo permitidos para este alimento.

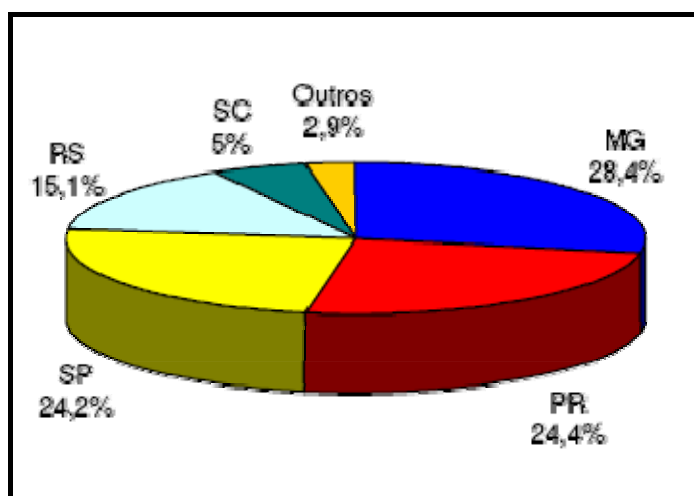
Existem ainda casos, como o do Instituto Biológico de São Paulo, que embora tenha realizado pesquisas que demonstraram a presença de piretróides em alimentos, os dados gerados não puderam ser publicados por estarem vinculados a projetos privados (OVIEDO et al., 2003).

Mas, a preocupação não é apenas de âmbito nacional, outras partes do mundo também têm dado atenção ao assunto. Por exemplo, no Japão pesquisadores do "Center for Inspection of Imported Foods and Infectious Diseases" detectaram resíduos de clorpirifós em cebola, chá e laranja, cipermetrina em chá e abacate, deltametrina em quiabo e laranja entre outros (HIRAHARA et al.; 2005).

### **1.3. A bataticultura e os agrotóxicos**

A batata (*Solanum tuberosum L.*), está entre os alimentos mais consumidos no mundo, sendo superada apenas pelo trigo, arroz e milho. No Brasil, condições favoráveis para o desenvolvimento da batata são encontradas nas regiões Sul e Sudeste, onde se destacam como maiores produtores os estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná (Figura 1). O estado de Minas

Gerais ocupa a liderança nacional, concentrando na região Sul aproximadamente 75,4% da produção mineira (PICANÇO et al.; 2004).



**Figura 1.** Participação dos principais estados brasileiros na produção de batata (PICANÇO et al., 2004).

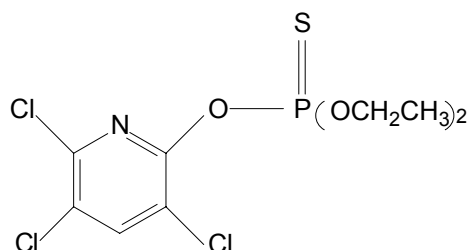
Um dos fatores limitantes da cultura da batata é a sua suscetibilidade a pragas e doenças. Várias espécies de insetos com hábitos subterrâneos têm ocasionado severos danos nas lavouras, ao perfurarem e abrirem galerias nos tubérculos, depreciando-os comercialmente (MALVONI et al., 2004).

Apesar do desenvolvimento de técnicas alternativas para controlar as pragas que prejudicam a bataticultura, como o uso de variedades resistentes, o controle cultural e o controle biológico, o uso de agrotóxicos ao longo de toda cultura ainda é o mais utilizado pelos produtores, que alegam que para se obter um cultivo lucrativo e competitivo este é o método mais eficaz (PICANÇO et al., 2004).

Para as condições brasileiras estão entre as pragas que atacam a cultura da batata e exigem atenção a larva - arame (*Conoderus* sp.) e a larva - alfinete (*Diabrotica* sp.) (NAKANO et al., 2001; MALVONI et al., 2004). Para o controle destas larvas é recomendado o uso do inseticida clorpirifós (Figura 2) (NAKANO et al., 2001).

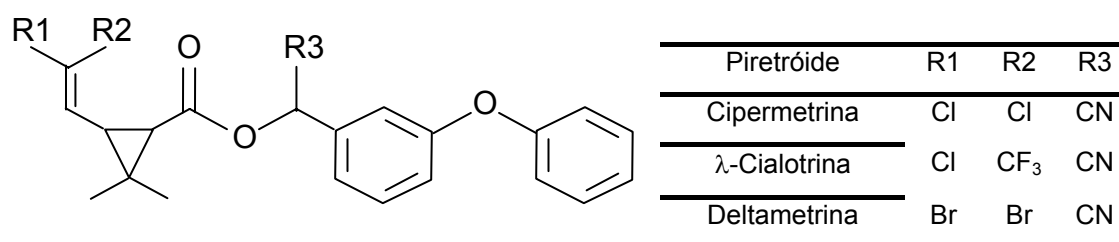
O clorpirifós (0,0-dietil-0-(3,5,6-tricloro-piridil)-fósforo-tionato), apresenta-se na forma de um sólido branco cristalino, cujo ponto de fusão é de 42-43,5 °C e a pressão de vapor é de  $1,87 \times 10^{-5}$  mm Hg a 25 °C (WHO, 1975). É

altamente tóxico (classe II) e muito perigoso para o meio ambiente (PENA et al., 2003a).



**Figura 2.** Fórmula estrutural do inseticida organofosforado clorpirifós.

Além deste inseticida organofosforado, a ANVISA permite a aplicação foliar dos piretróides, cipermetrina, deltametrina e  $\lambda$ -cialotrina (Figura 3) para o controle de pragas que prejudicam a bataticultura (ANVISA, 2005a).



**Figura 3.** Fórmula estrutural de piretróides sintéticos e seus radicais.

A  $\lambda$ -cialotrina, (RS)- $\alpha$ -ciano-3-fenoxibenzil 3-(2-cloro-3,3,3-trifluoropropenil)-2,2,-dimetilciclopropanocarboxilato, é um sólido transparente de massa molar 449,9 g/mol e ponto de fusão de 49,2 °C, sendo solúvel em acetona, metanol, tolueno e hexano (ETN, 2006).

A cipermetrina, (RS)- $\alpha$ -ciano-3-fenoxibenzil (1RS)-cis-trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetil ciclopropano carboxilato, apresenta massa molar igual a 416,3 g/mol e pressão de vapor igual a  $1,4 \times 10^{-9}$  mm Hg a 20 °C. É altamente estável a luz e a temperaturas abaixo de 220 °C e solúvel em diversos solventes orgânicos como acetona, cicloexano, etanol, hexano e clorofórmio (WHO, 1989).

Já a deltametrina, (S)-ciano-3-fenoxibenzil (1R)-cis-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato, apresenta-se sólida à temperatura ambiente com ponto de fusão de 98 a 101 °C. Sua massa molar é 505,24 g/mol e pressão de vapor  $1,5 \times 10^{-8}$  mm Hg a 25 °C. É estável a luz, ao calor e ao ar

e solúvel nos solventes, acetona, acetato de etila, etanol e ciclohexano (WHO, 1990).

Os valores de limite máximo de resíduos (LMR), ou seja, a quantidade máxima de agrotóxico legalmente aceita em batata, para o clorpirifós, deltametrina, cipermetrina e  $\lambda$ -cialotrina, estabelecidos na monografia da ANVISA, 2005a, são respectivamente, 1,0; 0,01; 0,05 e 0,05 mg kg<sup>-1</sup>. O LMR leva em consideração a Ingestão Diária Aceitável (IDA), que vem a ser a quantidade máxima que, ingerida diariamente durante toda a vida, parece não oferecer risco apreciável à saúde (GORENSTEIN, 2004).

#### 1.4. Metodologias de análise

A análise de resíduos de agrotóxicos é tradicionalmente, realizada utilizando-se a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (BELTRAN et al., 2000; GOBO et al., 2004; GALLI et al., 2006). Estas técnicas baseiam-se na distribuição diferencial das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa ou líquida) (COLLINS et al., 1997). Estas técnicas cromatográficas são muito importantes na análise dos compostos presentes em uma amostra em função de sua capacidade em efetuar as separações, identificar e quantificar as espécies. Podem ser empregados detectores seletivos, tais como: espectrômetro de massas (EM), por captura de elétrons (DCE), ionização em chama (DIC), ultra-violeta-visível (UV) (GALLI et al., 2006), etc.

Os sistemas em que a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida são acopladas a um espectrômetro de massas, oferecem a vantagem da confirmação e da quantificação simultânea de um grande número de agrotóxicos (LANÇAS, 1993; AHMED, 2001, AGÜERA et al., 2002). A identificação é feita através da interpretação das informações estruturais obtidas dos espectros de massas, que é característico de cada substância, enquanto que a quantificação é realizada a partir dos dados obtidos dos cromatogramas convencionais. Quando os compostos presentes na amostra já

foram identificados, a sensibilidade e a seletividade podem ser aumentadas, efetuando-se a análise no modo de monitoramento de íons selecionados (SIM - Selected Ion Monitoring). Nesse caso, apenas fragmentos específicos dos compostos serão selecionados e detectados (COLLINS et al., 1997).

Dependendo do detector utilizado, a cromatografia pode fornecer resultados com limites de detecção na faixa de nanograma a micrograma/L ( $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), por isso as aplicações de técnicas cromatográficas cresceram intensamente nos últimos 50 anos, pela necessidade de métodos precisos e sensíveis para caracterização e quantificação de analitos de interesse em matrizes complexas, tais como solos, alimentos, sangue, urina e outros tipos fluidos biológicos (GALLI et al., 2006).

Contudo, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), apresenta inconvenientes como alto custo de instrumentação e operação (PENA et al., 2003a), fazendo com que os métodos de análise por cromatografia gasosa sejam cada vez mais difundidos.

Esta por sua vez, depende da qualidade da etapa de preparo da amostra, pois quase nenhuma matriz pode ser diretamente injetada no cromatógrafo a gás. Este é o caso típico de análise de matrizes de origem ambiental, que via de regra contêm particulados não voláteis e água em quantidades incompatíveis com a coluna cromatográfica e detectores do CG (VALENTE & AUGUSTO, 2000).

Portanto, a viabilização da análise por CG depende de um método adequado de preparo da amostra. Geralmente no caso de frutas e hortaliças essas etapas consistem na extração do analito da matriz, purificação para remoção de impurezas, pré-concentração dos analitos, e finalmente a análise instrumental (KAIPPER et al., 2001; GOBO et al., 2004).

## 1.5. Métodos multirresíduos para análise de agrotóxicos em alimentos

Atualmente, existem cerca de 600 ingredientes ativos, utilizados na formulação de agrotóxicos, registrados para uso específico na agricultura. Destes, 350 contribuem com 98 % dos agrotóxicos mais utilizados, sendo que 80 % deles são rotineiramente usados na agricultura de países da América do Sul, como o Brasil. De acordo com um estudo realizado pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola (SINDAG), somente no ano de 2003 foram gastos 3,136 bilhões de dólares na comercialização de agrotóxicos no país, o que corresponde a 160,1 mil toneladas lançadas ao meio ambiente (GALLI et al., 2006). Estes agrotóxicos compreendem uma larga variedade de substâncias químicas com diferentes grupos funcionais e características. Conseqüentemente diferentes tipos de resíduos podem estar presentes simultaneamente em alimentos, o que torna cada vez mais inviável, economicamente e operacionalmente, utilizar métodos analíticos individuais com o objetivo de analisar resíduos de agrotóxicos em alimentos (MACIEL, 2005; GALLI et al., 2006). Por isso vários estudos têm sido realizados com o intuito de se desenvolver métodos multirresíduos capazes de determinar mais de um agrotóxico em uma simples análise e que também possam ser realizados com tempo e custo inferiores. (AHMED, 2001; NUNES et al., 2002; GOBO et al., 2004).

Os métodos multirresíduos usados para determinar resíduos de agrotóxicos em alimentos empregam a extração sólido-líquido seguida de uma etapa de “clean up”. A extração em fase sólida (EFS), é um dos métodos mais empregados para se efetuar esse “clean up”. Na literatura são encontradas várias referências com a aplicação desta metodologia analítica.

Em 2001, KAIPPER et al., extraíram quatro agrotóxicos organofosforados em tomates com acetato de etila e purificaram os extratos com carvão ativo usando a extração em fase-sólida (EFS). Essa mesma metodologia foi empregada por, ŠTAJNBAHER & ZUPANČIČ-KRALJ (2003) para determinação de 90 agrotóxicos em frutas e vegetais.

Há ainda, estudos de 102 agrotóxicos em alho-poró realizado por SHULING et al. (2006) utilizando a combinação EFS e cromatografia por

permeação em gel (CPG), para eliminar os interferentes dos extratos. HIRAHARA et al. (2005), conseguiram analisar 186 agrotóxicos em 11 diferentes tipos de matriz, brócolis, cenoura, espinafre, laranja entre outros, empregando uma convencional extração por solventes seguida por uma etapa de EFS. Em abacate, matriz rica em óleos, 65 agrotóxicos foram analisados utilizando após a etapa de extração a CPG para limpeza dos extratos (MORENO et al., 2006). Essas técnicas tradicionais para análise de resíduos de agrotóxicos com extração por solventes são normalmente muito trabalhosas e envolvem um tempo de preparo e extração da amostra demasiadamente longo além do grande consumo de solventes (NUNES et al., 2002; CARDOSO et al., 2004). Em razão disso, as técnicas de extração têm evoluído, sendo desenvolvidas técnicas como a micro-extração em fase sólida (MEFS) (SIMPLÍCIO & BOAS, 1999; LAMBROPOULOU & ALBANIS, 2002), a dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) (DÓREA & LOPES, 2004; CARDOSO et al., 2004; GOBO et al., 2004) entre outras, para análise multirresíduo de agrotóxicos em alimentos.

Estas técnicas, porém requerem instrumentações mais sofisticadas e analistas qualificados, adequadamente treinados, para se obter resultados de qualidade. Assim, a extração com solventes, continua sendo a técnica mais empregada, por ser mais simples e de fácil execução. Porém, vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de otimizar e minimizar principalmente o consumo de solventes e as etapas de “clean up” utilizados nesta técnica.

Em 2004, GOULART desenvolveu uma metodologia, para análise de deltametrina e cipermetrina em leite. No método, chamado extração líquido-líquido e purificação por precipitação a baixa temperatura, os piretróides foram extraídos de 20,0 mL de leite fortificado com 40,0 mL de acetonitrila. Posteriormente, em 2005, denominando a técnica de extração líquido-líquido e partição em baixa temperatura (ELL-PBT) e extração sólido-líquido e partição em baixa temperatura (ESL-PBT) VIEIRA estudou a extração simultânea de cipermetrina, deltametrina,  $\lambda$ -cialotrina e permetrina de 4,0 mL de água e 1,0 g de solo, com 8,0 mL das misturas acetonitrila:acetato de etila e água:acetonitrila:acetato de etila, respectivamente. A técnica consiste em colocar a amostra líquida ou sólida em contato com um solvente extrator menos denso que a água e que se apresente líquido a  $-20$  °C. Posteriormente, a

amostra é agitada e levada ao freezer por um período mínimo de seis horas. Nesta etapa, o sólido junto com a fase aquosa são congelados tornando-se sólidos na parte inferior do recipiente utilizado, e a fase superior contendo o solvente e os agrotóxicos extraídos é separada e analisada por cromatografia gasosa. Ambas as pesquisadoras, mostraram que a técnica é simples, de baixo custo e eficiente, apresentando taxas de recuperação acima de 80 % para todos os compostos estudados, com um menor consumo de solvente e ausência de etapas de purificação para análise cromatográfica dos extratos.

A precipitação de gorduras a baixa temperatura realizada por GOULART (2004) foi utilizada no passado para o “clean up” de extratos de plantas e animais na análise de agrotóxicos organoclorados e organofosforados (JUHLER, 1997; LENTZA-RIZOS et al., 2001). JUHLER (1997), revisando as informações desta técnica concluiu que o que impediu a prorrogação de sua aplicação foi a temperatura usada para a precipitação da gordura (-78 °C). Ele então mostrou em um trabalho realizado com carnes e matrizes gordurosas que a remoção gravimétrica da gordura por meio do congelamento quando combinada com a extração em fase sólida resultava em um “clean up” suficiente para a determinação de sete agrotóxicos organofosforados. Assim, outros trabalhos começaram a serem desenvolvidos utilizando o abaixamento de temperatura, como a extração de inseticidas e herbicidas em óleo de oliva (LENTZA-RIZOS et al., 2001).

Os solventes mais empregados nos métodos multirresíduos para análise de agrotóxicos são a acetonitrila, a acetona e o acetato de etila. Segundo MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY (2004), um solvente ideal a ser empregado na determinação de agrotóxicos por cromatografia gasosa deve ser compatível com os analitos, com a preparação da amostra e a análise cromatográfica. Basicamente, estes três pré-requisitos significam que os analitos de interesse devem ser suficientemente solúveis e estáveis no solvente, esse mesmo solvente deve ser usado nas etapas de extração e “clean up”, evitando troca de solvente, e as suas propriedades físico-químicas não devem interferir na separação e detecção dos picos durante a análise cromatográfica. Outros atributos importantes de um solvente ideal incluem: baixa toxicidade e inflamabilidade, baixo custo e pequeno risco ambiental.

Além disso, o solvente para ser utilizado na extração por purificação em baixa temperatura deve apresentar miscibilidade na água, densidade inferior à da água e apresentar-se líquido a temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A miscibilidade em água está diretamente relacionada com a maior habilidade de formação da fase única e posterior formação de duas fases, por abaixamento de temperatura. A seletividade está relacionada com a maior afinidade dos componentes de interesse pela fase orgânica em relação à fase aquosa e à habilidade de evitar componentes interferentes da matriz no extrato final (VIEIRA, 2005). Logo, tanto a acetonitrila quanto a acetona, podem ser usados (Tabela 1).

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas dos solventes: acetonitrila, acetona e acetato de etila.

	Acetato de etila	Acetona	Acetonitrila
Densidade ( $\text{kg L}^{-1}$ )	0,90	0,79	0,78
Temperatura de fusão ( $^{\circ}\text{C}$ )	-83	-95	-46
Temperatura de ebulição ( $^{\circ}\text{C}$ )	77	56	81
Miscibilidade em água ( $\text{g L}^{-1}$ )	80	Sem limite	Sem limite

Entretanto, o uso da acetona durante a extração requer a troca por outro solvente, mais favorável à análise cromatográfica. Assim, a acetonitrila mostra-se como o solvente mais adequado. Além disso, segundo ANASTASSIADES et al. (2003) a acetonitrila extrai menor quantidade de gorduras e pigmentos, quando comparado com o acetato de etila e a acetona.

## 1.6. Efeito da matriz nos métodos multirresíduos

Nas análises por cromatografia gasosa, alguns analitos podem gerar picos que mostram uma baixa resposta ou formas que dificultam a integração. Estes problemas podem ser originados pela degradação parcial do analito a altas temperaturas no sistema de injeção ou por uma baixa transferência para a

coluna cromatográfica devido a sua retenção nos sítios ativos do injetor (SÁNCHEZ-BRUNETE et al., 2005).

Contudo, quando componentes da amostra estão presentes na solução injetada, estes podem se adsorver e bloquear sítios ativos do “liner” de vidro do sistema de injeção, diminuindo a interação entre os analitos e os sítios ativos, permitindo então que uma maior quantidade de analito seja transferida para a coluna cromatográfica, que chegará em sua totalidade no detector gerando um aumento na resposta cromatográfica. Este fenômeno é conhecido como efeito de matriz (BERNAL et al., 1997; SCHENCK & LEHOTAY, 2000; IMOTO, 2004; SÁNCHEZ-BRUNETE et al., 2005) e tem sido descrito na análise de agrotóxicos em diversas amostras como: vinho, leite, manteiga (BERNAL et al., 1997), mel (JIMÉNEZ et al.; 1998), frutas e vegetais (HAJŠLOVÁ et al., 1998; SCHENCK & LEHOTAY, 2000). Problemas devido a presença de impurezas nas amostras analisadas também podem ser encontrados nos sítios da coluna cromatográfica (HAJŠLOVÁ et al., 1998; SCHENCK & LEHOTAY, 2000).

Freqüentemente, o efeito da matriz é relatado na literatura como uma das principais causas de erros em métodos multirresíduos, pois o fenômeno resulta em recuperações maiores que 100 % (SÁNCHEZ-BRUNETE et al., 2005). Esse fato foi observado por GOBO et al. (2004) na análise de organofosforados em tomate e JIMÉNEZ et al. (1998), na análise de agrotóxicos em mel, em que foram obtidas porcentagens de recuperação acima de 200 e 1000 %, respectivamente.

Alguns fatores que podem afetar o efeito de matriz incluem: natureza do agrotóxico, natureza da matriz e o sistema do CG. Algumas precauções podem ser tomadas para superar ou reduzir o efeito de matriz, as quais incluem: adição de componentes da matriz nas soluções padrão, uso de soluções padrão preparadas no extrato do branco da matriz, uso do método adição de padrão, exaustivos processos de “clean up” para reduzir componentes da matriz no extrato e uso de injeção na coluna (SCHENCK & LEHOTAY, 2000; ANASTASSIADES et al., 2003).

Idealmente, superfícies inertes no sistema do CG poderiam eliminar o efeito de matriz, mas superfícies a base de sílica, até mesmo sílica fundida, contém um grande número de sítios ativos, por exemplo, grupos silanóis e íons metálicos. O uso de “liner” recobertos e ou técnicas de injeção alternativas,

como uma injeção sem divisor de fluxo ou injeção na coluna, podem ser efetivas na redução do efeito (SCHENCK & LEHOTAY, 2000).

O uso de soluções padrão preparadas em extratos do branco é a opção mais comum seguida por muitos laboratórios para reduzir o efeito de matriz nas análises. Suas desvantagens podem incluir maior degradação dos analitos na presença do extrato e um trabalho extra para o preparo dos padrões (SCHENCK & LEHOTAY, 2000). Além disso, o método ainda exige a disponibilidade de matrizes isentas das substâncias de interesse e não elimina situações como as diferentes concentrações de interferentes de uma amostra para outra, fato que pode ser observado quando analisados alimentos em diferentes estágios de maturação.

## 1.7. Objetivos desse trabalho

Como descrito anteriormente existem inúmeras técnicas de extração e “clean up” de extratos para análise de agrotóxicos por cromatografia gasosa. Cada técnica tem suas particularidades, ou seja, algumas vantagens e outras desvantagens. De maneira geral, as vantagens explicitadas estão relacionadas com a sensibilidade do método, a pureza dos extratos e a diminuição das interferências. As desvantagens, normalmente citadas por outros, estão relacionadas com o consumo elevado de solvente, o alto custo dos equipamentos e a necessidade de certa habilidade na execução dos processos.

Com os resultados promissores obtidos por duas pesquisadoras do Laboratório de Química Analítica - LAQUA (GOULART, 2004; VIEIRA, 2005), usando a técnica ELL-PBT e ESL-PBT, procurou-se neste trabalho otimizar e validar essa metodologia para a extração e análise simultânea de resíduos dos inseticidas, clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, em batata.

Em duas outras etapas, buscou-se avaliar o efeito da matriz no método ESL-PBT com análise por cromatografia gasosa e aplicar a metodologia validada em amostras de batata cultivadas na região Sul do estado de Minas

Gerais e do comércio da cidade de Viçosa-MG, a fim de se avaliar a qualidade das batatas cultivadas e consumidas no estado.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Preparo de soluções padrão

As soluções padrão dos princípios ativos estudados foram preparadas a partir de padrões de clorpirifós (99,0 % m/m – Chem Service),  $\lambda$ -cialotrina (86,5 % m/m – Syngenta), cipermetrina (92,4 % m/m – Chem Service) e deltametrina (99,0 % m/m – Chem Service). Uma solução estoque de 1.000,0 mg L<sup>-1</sup> de cada um dos compostos foi preparada em acetonitrila (Mallinckrodt/HPLC). A solução de trabalho contendo os quatro agrotóxicos de interesse na concentração de 50,0 mg L<sup>-1</sup>, foi preparada a partir da diluição da solução estoque. As demais soluções foram obtidas a partir da solução de 50,0 mg L<sup>-1</sup>.

Uma solução de bifentrina (92,2 % m/m – FMC do Brasil) 100,0 mg L<sup>-1</sup>, utilizada como padrão interno, foi preparada em acetonitrila de forma semelhante à solução de trabalho de 50,0 mg L<sup>-1</sup>.

### 2.2. Amostras de batata

Para o processo de otimização e validação da metodologia de análise multirresíduo dos agrotóxicos clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, foram utilizadas amostras de batatas não contaminadas, fornecidas por técnicos da Associação de Bataticultores do Sul de Minas Gerais (ABASMIG) e da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER-MG).

Posteriormente, a técnica otimizada foi aplicada em sete amostras de batata adquiridas de cinco bataticultores do Sul de Minas Gerais. Estas amostras receberam a aplicação de produtos comerciais, com princípios ativos dos compostos em estudo. Porém, três amostras foram cultivadas pelo Sistema de Produção Integrada de Batata (PIB), ou seja, pela implantação de boas práticas agrícolas.

Também foram analisadas duas amostras adquiridas no comércio de Viçosa-MG.

Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, vedadas, identificadas e armazenadas em freezer. No momento das análises, foram deixadas à temperatura ambiente até descongelarem.

### **2.2.1. Fortificação das amostras de batata**

Denomina-se fortificação, o processo de adição da solução dos agrotóxicos em concentrações conhecidas, à matriz. Entretanto, a adição de um volume excessivo da solução de trabalho à pequenas quantidades de amostra pode ocasionar em perdas dos agrotóxicos, pois parte dos compostos podem ficar no recipiente utilizado (DÓREA & LOPES, 2004).

Após atingirem a temperatura ambiente, as batatas foram picadas em pedaços pequenos e estes triturados em um multiprocessador doméstico até que uma massa homogênea fosse obtida. Em seguida, uma pequena quantidade da amostra triturada (3,000 g), foi fortificada, com 0,1 mL da solução de trabalho contendo os quatro inseticidas na concentração de 50,0 mg L<sup>-1</sup>, a fim de se obter no extrato final ( $V_{\text{final}} = 10,0$  mL), após a extração, uma concentração máxima igual a 0,5 mg L<sup>-1</sup> de cada pesticida.

Após este processo, as amostras foram submetidas ao ultra-som por 2 minutos e deixadas em repouso por aproximadamente 3 horas para que houvesse maior interação dos agrotóxicos com a amostra. Posteriormente, estas amostras foram submetidas aos procedimentos de extração, para determinação das condições ótimas para análise dos inseticidas clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, por cromatografia gasosa.

## 2.3. Otimização da técnica de extração ESL-PBT

Nos protocolos experimentais de Química Analítica que envolvem otimização, estão o desenvolvimento de novos métodos de análise e o melhoramento ou adaptação de métodos já estabelecidos, estudando-se variáveis que exibem efeitos significativos na resposta e que podem ser ajustados para melhorar a eficiência do método (EIRAS & ANDRADE, 1995).

No processo de otimização da técnica ESL-PBT as condições de análise dos inseticidas clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em batata foram avaliadas procurando-se obter os melhores rendimentos com menor tempo de análise e baixo custo. Alguns fatores que influenciam os resultados da técnica tais como: tipo de mistura extratora, força iônica, vibração ultrassônica, tipo de congelamento, tempo de extração e fortificação foram avaliados usando amostras de batata fortificadas. A quantificação dos analitos foi realizada por cromatografia gasosa utilizando o método do padrão interno.

### 2.3.1. Extração dos inseticidas em batata

3,000 g de batata triturada e fortificada (item 2.2.1), foram adicionadas à um frasco de vidro transparente com tampa de plástico (30,0 mL de capacidade). Em seguida, volumes de água, acetonitrila e acetato de etila, formando 10,0 mL de uma fase única, (misturas extratoras 1, 2 e 3, Tabela 2, item 2.3.1.1) foram adicionados. A mistura obtida foi mantida sob agitação a 170 oscilações por minuto (opm) em uma mesa agitadora (Tecnal TE - 420), por 10 minutos, a 28 °C.

Posteriormente, as amostras foram colocadas em um freezer a aproximadamente -20°C, por 12 horas. Após este período, a fase orgânica líquida foi passada por um papel de filtro contendo 1,5 g de sulfato de sódio anidro (Nuclear – PA), sendo o papel de filtro previamente lavado com 5,0 mL de acetonitrila resfriada. Os volumes dos extratos obtidos, foram ajustados em balões volumétricos para 10,0 mL, com acetonitrila e armazenados em frascos de vidro no freezer até o momento da análise cromatográfica.

A seguir, estão descritas as etapas realizadas no processo de otimização da técnica ESL-PBT, para análise dos resíduos de agrotóxicos em batata.

### **2.3.1.1. Planejamento experimental para escolha da mistura extratora**

Um experimento com misturas descreve, dentro dos limites experimentais, o comportamento de um sistema multicomponente a partir de um número limitado de ensaios. Para misturas de três componentes o espaço experimental, denominado de “simplex”, é um triângulo equilátero (GARCIA, 2003).

Para a extração e análise dos princípios ativos de interesse em batatas utilizando a ESL-PBT, foi realizado, um planejamento experimental de misturas, para estudar a proporção entre, água, acetonitrila e acetato de etila que produziria a maior porcentagem de extração dos compostos.

O experimento foi limitado a uma sub-região do espaço experimental para misturas de três componentes (Figura 4), com a determinação de limites inferiores e superiores para cada solvente da mistura extratora:

Limite inferior

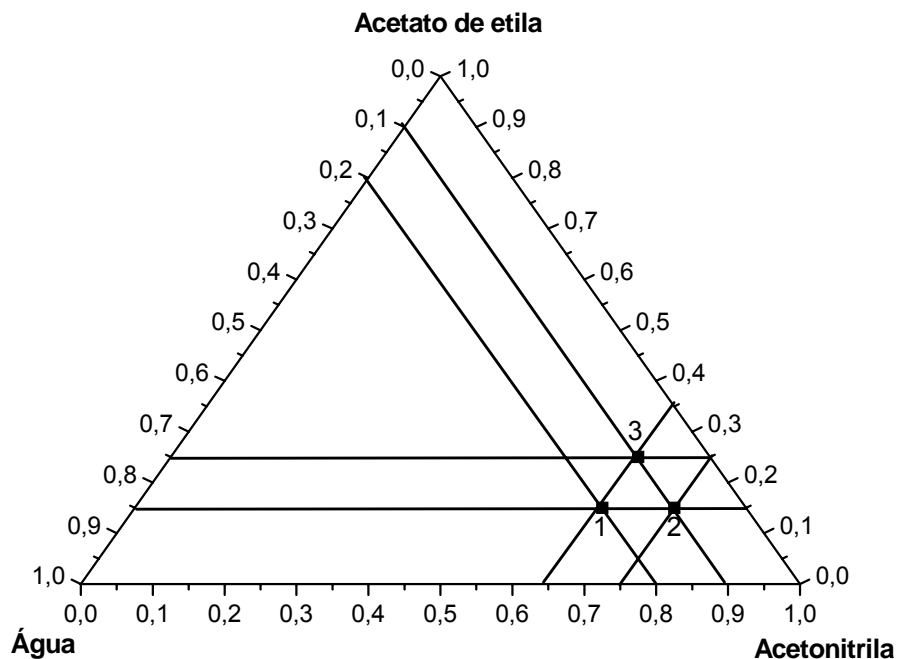
Limite superior

$$10 \% \leq \text{Água} \leq 20 \%;$$

$$65 \% \leq \text{Acetonitrila} \leq 75 \%$$

$$15 \% \leq \text{Acetato de etila} \leq 25 \%$$

Nesses limites estabelecidos, as misturas extratoras mantêm as características necessárias para a técnica ESL-PBT, ou seja, formam uma fase única e parte da mistura não se congela a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 4.** Espaço experimental (triângulo equilátero) das três variáveis da mistura extratora. A região estudada, foi determinada pelos limites inferiores e superiores dos volumes de água, acetonitrila e acetato de etila, que resultou em um triângulo menor, cujos vértices estão numerados de 1 a 3.

Os limites demarcaram no interior do triângulo equilátero um novo triângulo, menor. Os pontos correspondentes aos vértices do novo triângulo, numerados de 1 a 3, representam as misturas extratoras que inicialmente foram estudadas (Tabela 2). O volume total da mistura adicionada às amostras de batata fortificadas, foi igual a 10,0 mL, sendo então estabelecido as proporções volumétricas de cada componente, que foram usadas para cada ensaio do planejamento (Tabela 2).

**Tabela 2.** Composição das misturas extratoras empregadas na ESL-PBT de amostras de batata fortificadas com os princípios ativos de interesse.

Mistura extratora	Componentes			Volume total da mistura (mL)	Volumes adicionados		
	Água (%)	Acetonitrila (%)	Acetato de etila (%)		Água (mL)	Acetonitrila (mL)	Acetato de etila (mL)
1	20	65	15	10,0	2,0	6,5	1,5
2	10	75	15	10,0	1,0	7,5	1,5
3	10	65	25	10,0	1,0	6,5	2,5

Para avaliar o efeito de cada mistura na ESL-PBT em batatas foram estimadas equações de regressão, as quais foram relacionadas ao modelo polinomial linear, e superfícies de respostas a partir das porcentagens de recuperação médias obtidas para cada um dos inseticidas.

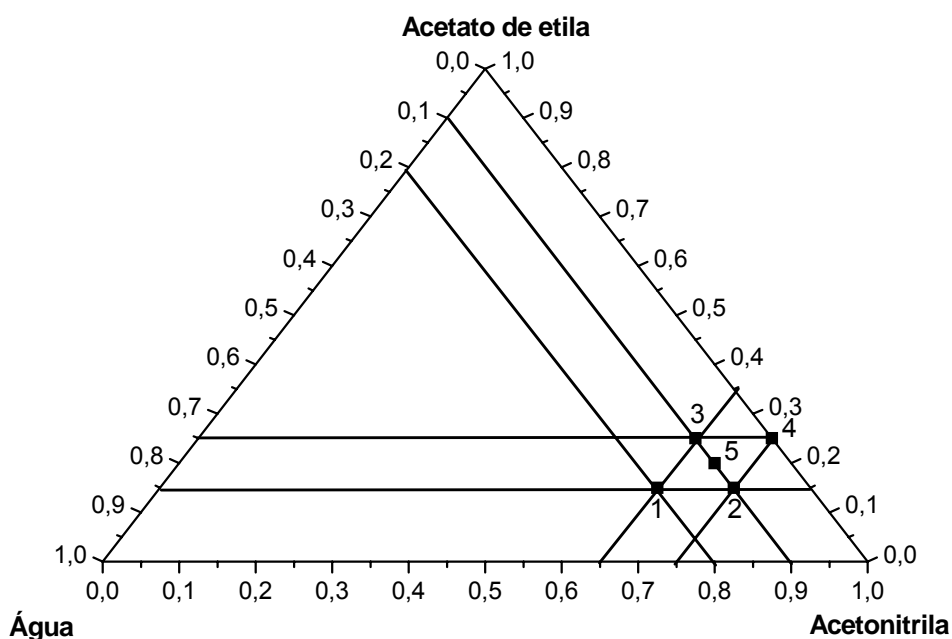
### 2.3.1.2. Avaliação da força iônica na eficiência da extração

A influência da força iônica na taxa de recuperação dos compostos em batata foi estudada nas misturas 1, 2 e 3 do planejamento (item 2.3.1.1). Esta força iônica, foi obtida por uma solução aquosa de NaCl (Reagen – P.A.)  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ .

Às amostras de batata previamente fortificadas com os agrotóxicos de acordo com o item 2.2.1, foi adicionada ao invés de água, uma solução de cloreto de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , acetonitrila e acetato de etila, de acordo com os dados da Tabela 2 (item 2.3.1.1), para as misturas de solventes 1, 2 e 3. As etapas seguintes de agitação mecânica, congelamento e passagem por um papel de filtro com sulfato de sódio anidro, foram as mesmas utilizadas no item 2.3.1.

### 2.3.1.3. Deslocamento no planejamento da mistura extratora

Nesta etapa, foi realizado um deslocamento do planejamento de misturas descrito no item 2.3.1.1, sendo determinado dois novos pontos no espaço experimental, numerados como 4 e 5 (Figura 5).



**Figura 5.** Espaço experimental (triângulo equilátero) das três variáveis da mistura extratora. Primeira região estudada - triângulo menor, cujos vértices estão numerados de 1 a 3. Pontos 4 e 5 – novas proporções de água, acetonitrila e acetato de etila avaliadas.

Na Tabela 3, são mostradas as composições das novas misturas avaliadas.

**Tabela 3.** Composições das novas misturas extratoras empregadas em amostras de batata fortificadas.

Mistura extratora	Componentes			Volume total da mistura (mL)	Volumes adicionados		
	Água (%)	Acetonitrila (%)	Acetato de etila (%)		Água (mL)	Acetonitrila (mL)	Acetato de etila (mL)
4	0	75	25	10,0	0	7,5	2,5
5	10	70	20	10,0	1,0	7,0	2,0

As extrações dos quatro inseticidas de interesse, clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina pelo método ESL-PBT com as novas fases únicas, foram realizadas de forma semelhante à descrita no item 2.3.1.

As respostas usadas para avaliar todo o planejamento, foram as porcentagens de recuperação médias obtidas para cada um dos inseticidas após os ensaios de extração realizados em triplicatas com as diferentes misturas extratoras.

#### **2.3.1.4. Efeito da vibração ultra-sônica**

Avaliou-se o efeito das ondas ultra-sônicas na extração dos inseticidas em batata, realizando-se testes em amostras previamente fortificadas de acordo com o item 2.2.1, extraídas com as misturas de solventes 3 (1,0 mL de água, 6,5 mL de acetonitrila e 2,5 mL de acetato de etila – Tabela 2) e 5 (1,0 mL de água, 7,0 mL de acetonitrila e 2,0 mL de acetato de etila – Tabela 3), durante 15 minutos em um banho ultra-sônico (MaxiClean 750 - Unique). As misturas de solventes selecionadas foram as que apresentaram melhores eficiências de extração nos itens 2.3.1.1 e 2.3.1.3.

Para efeito de comparação, foi realizado simultaneamente uma extração empregando a mistura 3 com 20 minutos de agitação mecânica a 170 opm.

As etapas posteriores, tais como, congelamento e passagem por papel de filtro com sulfato de sódio anidro, foram idênticas às descritas no item 2.3.1.

#### **2.3.1.5. Avaliação do tipo de congelamento**

O efeito do tipo de congelamento das amostras na porcentagem de recuperação dos inseticidas também foi verificado durante os estudos de otimização da técnica. Dois tipos de congelamento foram simulados, através de observações de pontos no freezer em que ocorriam o congelamento diferenciado das misturas.

Este experimento foi realizado adicionando-se à 3,000 g de batata triturada e fortificada segundo o item 2.2.1, 1,0 mL de água, 6,5 mL de acetonitrila e 2,5 mL de acetato de etila. Em seguida, as amostras foram submetidas ao ultra-som por 15 minutos e colocadas no freezer, dentro da

gaveta em caixas de isopor e diretamente no congelador, em contato com uma superfície coberta por gelo.

Decorrido o tempo de 12 h, os extratos foram tratados seguindo o mesmo procedimento do item 2.3.1.

#### 2.3.1.6. Avaliação da mistura extratora água/acetonitrila/metanol

Outro fator que também foi avaliado durante a otimização da ESL-PBT para a extração dos princípios ativos de batatas foi a presença de metanol na mistura extratora.

À 3,000 g de amostras de batata fortificada com os inseticidas, foram adicionadas misturas de água, acetonitrila e metanol (Mallinckrodt – grau pesticida) de acordo com a Tabela 4.

**Tabela 4.** Volumes de água, acetonitrila e metanol empregados na extração dos inseticidas em batata.

Água (mL)	Acetonitrila (mL)	Metanol (mL)
1,0	6,5	2,5
1,0	8,5	0,5
1,0	8,8	0,2

Após a adição da mistura extratora, as amostras foram mantidas sob sonicação por 15 minutos. Posteriormente, foram levadas ao freezer a -20 °C por 12 horas. Em seguida, o extrato obtido, após a passagem da fase orgânica pelo papel de filtro com sulfato de sódio anidro, foi armazenado em frascos de vidro no freezer até o momento da análise cromatográfica.

#### 2.3.1.7. Avaliação do tempo de extração

O tempo de contato entre as fases (matriz e mistura extratora) durante a etapa de extração é considerado um fator importante, podendo influenciar na porcentagem de extração dos compostos de interesse.

Por isso, este parâmetro foi avaliado neste trabalho, realizando-se extrações dos inseticidas de amostras de batata fortificadas com 1,6 µg g<sup>-1</sup>

(item 2.2.1) de cada pesticida, com 1,0 mL de água, 6,5 mL de acetonitrila e 2,5 mL de acetato de etila. Na etapa de extração, foram avaliados os tempos de 1, 3, 5, 10 e 15 minutos de sonicação.

Após as etapas de congelamento e passagem por papel de filtro com sulfato de sódio anidro, os extratos foram recuperados em 10,0 mL de acetonitrila e armazenados no freezer até o momento da determinação por cromatografia gasosa.

#### **2.3.1.8. Avaliação do tempo de fortificação**

O estudo foi realizado, mantendo-se em repouso sob condições ambientais, aproximadamente 25-35 °C, triplicatas das amostras de batata trituradas e fortificadas com os quatro inseticidas (item 2.2.1), por períodos que variaram de 0, 3, 5, 7, 24, 168 e 432 horas.

Decorrido o intervalo de tempo estipulado para as amostras, adicionou-se 1,0 mL de água, 6,5 mL de acetonitrila e 2,5 mL de acetato de etila, ou seja, as proporções indicadas pela mistura extratora 3 (Tabela 2 – item 2.3.1.1, pág.22). Em seguida as mesmas foram colocadas no banho ultra-sônico por 10 minutos.

As etapas de congelamento e passagem por papel de filtro com sulfato de sódio anidro, foram idênticas as descritas no item 2.3.1.

#### **2.3.1.9. Planejamento fatorial**

Foi realizado um planejamento fatorial  $2^3$  para estudar o comportamento simultâneo dos fatores: (F1) proporção entre o volume de água, acetonitrila e acetato de etila, (F2) força iônica e (F3) tempo de extração. Para cada um dos fatores foram estudados dois níveis, nível máximo (+) e nível mínimo (-).

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 (-). Estes ensaios foram feitos em duplicatas perfazendo um total de dezesseis. A listagem destas combinações é apresentada na Tabela 5.

**Tabela 5.** Matriz do planejamento fatorial  $2^3$  para avaliação de três fatores, F1 - proporção dos solventes da mistura extratora, F2 - força iônica e F3 – tempo de sonicação, na porcentagem de extração dos inseticidas em batata.

Ensaio	Fatores codificados			Fatores originais		
	F1	F2	F3	(1) Proporção	(2) Força iônica (mol L <sup>-1</sup> )	(3) Tempo (min)
1 e 1r	-	-	-	2,0/6,5/1,5 (A)	0,0	1
2 e 2r	+	-	-	1,0/6,5/2,5 (B)	0,0	1
3 e 3r	-	+	-	2,0/6,5/1,5 (A)	0,2	1
4 e 4r	+	+	-	1,0/6,5/2,5 (B)	0,2	1
5 e 5r	-	-	+	2,0/6,5/1,5 (A)	0,0	10
6 e 6r	+	-	+	1,0/6,5/2,5 (B)	0,0	10
7 e 7r	-	+	+	2,0/6,5/1,5 (A)	0,2	10
8 e 8r	+	+	+	1,0/6,5/2,5 (B)	0,2	10

F1 = Proporção (água:acetoneitrila:acetato de etila), F2 = Força iônica (solução de NaCl), F3 = Tempo de sonicação.

Cada um dos ensaios foi realizado adicionando-se a 3,000 g de polpa de batata fortificada (item 2.2.1), a mistura de solventes com força iônica correspondente ao nível (+) e (-) do planejamento. Posteriormente, a amostra, foi mantida sob sonicação por 1 ou 10 minutos, de acordo com o planejamento.

As porcentagens de recuperação obtidas no experimento para cada um dos inseticidas estudados foram utilizadas para avaliar os efeitos de cada fator.

## 2.4. Análise cromatográfica

A análise qualitativa e quantitativa dos princípios ativos estudados foi realizada em um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-17A equipado com um detector por captura de elétrons (DCE).

As condições analíticas estabelecidas para as análises, após a realização de vários testes, tais como, temperatura da coluna, do injetor e do

detector, vazão dos gases e escolha do tipo de coluna cromatográfica, foram determinadas visando um pequeno tempo de análise, com uma boa resolução entre os picos dos inseticidas de interesse.

A seguir encontram-se descritas as condições determinadas:

- Coluna capilar Agilent Technologies HP-5 com fase estacionária composta de 5 % de fenil e 95 % de dimetilpolissiloxano, 30 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e 0,1  $\mu\text{m}$  de espessura de filme.
- Programação de temperatura da coluna:  $200\text{ }^{\circ}\text{C} \xrightarrow{10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}} 290\text{ }^{\circ}\text{C}$  (2 min)
- Tempo total de análise: 11 minutos
- Temperatura do injetor:  $280\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Temperatura do detector (DCE):  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Volume injetado:  $1,0\ \mu\text{L}$
- Gás de arraste: Nitrogênio
- Vazão do gás de arraste:  $1,2\ \text{mL min}^{-1}$
- Divisão de fluxo: 1:5

#### 2.4.1. Quantificação

As quantificações dos inseticidas (clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina cipermetrina e deltametrina) foram feitas pelo método da padronização interna.

Soluções padrão de concentrações crescentes dos analitos (10,0; 25,0; 50,0; 125,0 250,0; 375,0; 500,0; 650,0; 750,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), contendo como padrão interno (PI) bifentrina  $0,5\ \text{mg L}^{-1}$ , foram analisadas no cromatógrafo a gás nas condições analíticas pré-determinadas. Construíram-se curvas analíticas, uma para cada princípio ativo, relacionando a razão entre as áreas do pico atribuído à substância de interesse e a área do pico do padrão interno (área do analito / área do padrão interno de concentração constante) com a concentração (variável) do pesticida.

Através da regressão linear destas curvas analíticas, foram obtidas equações da reta utilizadas no cálculo das concentrações dos agrotóxicos nas amostras. As amostras, durante a etapa de filtração, ou seja, antes das

análises, também receberam a adição de padrão interno (mesma quantidade e concentração adicionado nas soluções padrão), permitindo através da razão das áreas, determinar a concentração dos compostos presentes.

## 2.5. Validação do método analítico

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004). Na literatura, existem diversas formas de se conduzir a validação de um método analítico, no entanto, os principais parâmetros são: seletividade, linearidade de resposta do detector, limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez (INMETRO, 2003).

A metodologia otimizada proposta para a análise de clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, em amostras de batata, pelo método ESL-PBT, foi: extração de 3,000 g de batata triturada previamente fortificada, com 1,0 mL de água, 6,5 mL de acetonitrila e 2,5 mL de acetato de etila, sob 10 minutos de sonicação. Em seguida, as amostras foram colocadas em um freezer, a aproximadamente -20 °C por 12 horas. Decorrido esse período, as amostras foram filtradas com 1,5 g de sulfato de sódio anidro em papel de filtro previamente lavado com 5,0 mL de acetonitrila. Os extratos obtidos foram recuperados em balões volumétricos de 10,0 mL, aferidos com acetonitrila, transferidos para frascos de vidro e armazenados no freezer até o momento da análise cromatográfica.

O procedimento realizado para validação do método proposto, foi feito baseando-se nas recomendações do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2003), RIBANI et al. (2004), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP, 1999).

### 2.5.1. Seletividade

A fim de se determinar com exatidão os analitos de interesse, a seletividade do método foi avaliada através da comparação dos cromatogramas dos extratos obtidos após a extração de amostras de batata isenta dos inseticidas clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina com os cromatogramas dos extratos obtidos da matriz fortificada submetida ao procedimento otimizado descrito no item 2.5.

### 2.5.2. Linearidade de resposta do detector

A linearidade de resposta do detector foi determinada pela injeção de soluções padrão dos inseticidas clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em acetonitrila com concentrações crescentes: 10,0; 25,0; 50,0; 125,0; 250,0; 375,0; 500,0; 650,0 e 750,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Em todas as soluções foram adicionados 0,05 mL da solução padrão de bifentrina 100,0  $\text{mg L}^{-1}$ , utilizado como padrão interno. Após a análise cromatográfica, foram construídas curvas analíticas, relacionando as razões da área do analito e do padrão interno com as concentrações dos compostos estudados, conforme o procedimento descrito no item 2.4.1. A linearidade foi avaliada, através da regressão linear destas curvas analíticas.

### 2.5.3. Limite de detecção e limite de quantificação do CG-DCE

Os cálculos dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada um dos inseticidas estudados foram realizados pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004), em que o LD e o LQ podem ser expressos como:

$$\text{LD} = 3,3 \times \frac{s}{S} \qquad \text{LQ} = 10 \times \frac{s}{S}$$

Onde:

s = estimativa do coeficiente linear da curva analítica.

S = inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.

Para obtenção destes dados, uma curva analítica foi construída utilizando soluções padrão contendo os inseticidas nas concentrações 12,0; 8,0; 6,0; 4,0 e 2,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

#### **2.5.4. Precisão**

A precisão do método ESL-PBT em batatas foi estimada através de um estudo intralaboratorial, avaliando-se a repetitividade e a precisão intermediária.

##### **2.5.4.1. Repetitividade**

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento, mesmo local e repetições em um curto intervalo de tempo (RIBANI et al., 2004). Este termo é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia, sendo utilizado também pelo INMETRO. Porém, a ANVISA utiliza o termo repetibilidade para o mesmo conceito.

A repetitividade do método ESL-PBT para análise de resíduos dos inseticidas clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em batata foi determinada realizando-se a extração dos agrotóxicos de amostras fortificadas ( $1,6 \mu\text{g g}^{-1}$ ) seguindo o procedimento do item 2.5, em sete repetições, para o cálculo da estimativa do desvio padrão relativo, conforme recomendações do INMETRO (2003).

##### **2.5.4.2. Precisão intermediária**

A precisão intermediária refere-se a precisão avaliada utilizando-se o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo-se exatamente quais as condições a variar, tais como: diferentes analistas, equipamentos ou tempo (INMETRO, 2003). O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI et al., 2004).

Para determinar a precisão intermediária do método ESL-PBT, foi efetuada em triplicatas, nas condições pré-estabelecidas no item 2.5, a extração dos quatro inseticidas de interesse de amostras de batata fortificadas ( $1,6 \mu\text{g g}^{-1}$ ) em quatro dias diferentes ( $1^\circ$ ,  $7^\circ$ ,  $30^\circ$  e  $60^\circ$  dia). Sendo então o efeito deste parâmetro avaliado através, do desvio padrão e do coeficiente de variação, determinados para cada ensaio.

### **2.5.5. Exatidão**

A exatidão de um método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro (INMETRO, 2003).

Os processos utilizados para avaliar a exatidão do método ESL-PBT foram o ensaio de recuperação e a comparação de métodos.

#### **2.5.5.1. Ensaio de recuperação**

A recuperação (ou fator de recuperação), R, é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI et al., 2004).

Nos ensaios de recuperação as substâncias de interesse foram adicionadas às amostras de batata trituradas em concentrações próximas a 1, 2 e 10 vezes o limite de quantificação (LQ) do CG-DCE (item 2.5.3). Desta forma, os testes foram realizados em triplicatas, extraíndo-se conforme o procedimento descrito no item 2.5, os inseticidas de amostras de batata, fortificadas pela adição de 0,05 e 0,1 mL da solução de trabalho contendo os quatro agrotóxicos na concentração de  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  e 0,1 mL da solução de trabalho de  $15,0 \text{ mg L}^{-1}$ .

Os valores das recuperações obtidas nos experimentos foram utilizados para avaliar este parâmetro.

### 2.5.5.2. Comparação de métodos

Os resultados obtidos para os compostos de interesse empregando-se o método otimizado ESL-PBT, em amostras de batata fortificadas, foram comparados aos resultados obtidos pela aplicação do método multirresíduo utilizado pelo IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária), a estas mesmas amostras, a fim de se avaliar o grau de proximidade entre os resultados fornecidos pelos dois métodos. Este método é utilizado para análise de resíduos de agrotóxicos em diversos alimentos (cenoura, morango, etc).

A metodologia multirresíduo do IMA (modificada) foi realizada através da extração de 15,0 g de batata triturada, previamente fortificada com 1,0 mL de uma solução padrão 5,0 mg L<sup>-1</sup> dos agrotóxicos avaliados (0,33 µg g<sup>-1</sup>), mais 15,0 g de sulfato de sódio anidro (Nuclear – PA), com 40,0 mL de acetona e 5 minutos de sonicação. Posteriormente, foi acrescentado 60,0 mL da mistura diclorometano:hexano (1:1) sendo a amostra sonicada por mais 5 minutos. O extrato foi filtrado em balão volumétrico de 100,0 mL adaptado com saída para vácuo, a fim de se evitar perdas, lavando-se todo o material utilizado com a mistura diclorometano:hexano (1:1). 10,0 mL do filtrado foi evaporado até a secura completa, em evaporador rotatório, e o resíduo recuperado em hexano, sendo o balão de evaporação de fundo redondo lavado duas vezes com 0,5 mL de hexano e o extrato (1,0 mL) transferido para frascos de vidro e estocados em freezer até a análise cromatográfica.

Os resultados obtidos pelos dois métodos foram comparados estatisticamente através do teste t de “student”.

### 2.5.6. Robustez

De acordo com o INMETRO (2003), a robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações.

Durante o desenvolvimento deste trabalho ocorreram mudanças de marcas e lotes dos solventes utilizados, troca de coluna cromatográfica, mudança na programação de temperatura da coluna e análises cromatográficas das amostras em épocas distintas, ou seja, pequenas variações que permitiram determinar a robustez método ESL-PBT para análise de agrotóxicos das em batatas.

## 2.6. Efeito da matriz no método multirresíduo ESL-PBT

Para verificação do possível efeito da matriz no método multirresíduo, foram construídos dois tipos de curvas analíticas. A primeira curva analítica foi construída com os agrotóxicos diluídos em acetonitrila (item 2.4.1) e a outra foi construída fortificando-se os extratos orgânicos, obtidos após a extração da matriz (batata Monalisa) isenta dos analitos, mas com todos os co-extrativos da batata.

Para obtenção das soluções padrões dos pontos da curva analítica no extrato orgânico da matriz, amostras trituradas de batata Monalisa, isentas dos agrotóxicos clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, foram submetidas ao procedimento de extração descrito no item 2.5. Porém, durante a etapa de recuperação dos extratos, alíquotas adequadas das soluções padrão dos inseticidas em concentrações de 25,0 e 0,50 mg L<sup>-1</sup> e 0,05 mL da solução padrão de bifentrina 100,0 mg L<sup>-1</sup> foram adicionados, a fim de se obterem em 10,0 mL de extrato final as concentrações de 10,0; 25,0; 50,0; 125,0; 250,0; 375,0; 500,0; 650,0; 750,0  $\mu$ g L<sup>-1</sup> dos analitos e 500,0  $\mu$ g L<sup>-1</sup> do padrão interno.

Após a análise das soluções padrão em acetonitrila e no extrato orgânico no CG/DCE foram construídas duas curvas analíticas para cada princípio ativo, utilizando o método do padrão interno. As retas obtidas proporcionaram a visualização do efeito da matriz nas curvas estudadas.

A curva analítica construída a partir da fortificação do extrato orgânico também foi utilizada para a quantificação dos agrotóxicos clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em amostras de batata.

### 2.6.1. Avaliação do efeito da matriz na análise cromatográfica em diferentes tipos de batata

A técnica ESL-PBT foi aplicada em duas variedades de batata, Monalisa e Asterix. Essas variedades têm cores bastante diferenciadas. Após trituradas e fortificadas (item 2.2.1), as amostras foram submetidas ao procedimento de

extração descrito no item 2.5 e analisadas por CG-DCE. Os extratos obtidos mostram-se límpidos, mas de coloração diferentes.

As porcentagens de recuperação dos quatro inseticidas de interesse foram determinadas pelo método do padrão interno, com a curva analítica preparada em extratos orgânicos obtidos de batatas Monalisa, conforme descrito no item 2.6.

### **2.6.2. Avaliação do efeito da matriz na análise cromatográfica em função do tempo e da forma de armazenamento de batatas e dos extratos**

Foi realizado, neste trabalho, um estudo do efeito da matriz na análise cromatográfica de extratos, obtidos de batatas inteiras e trituradas após serem armazenadas por diferentes intervalos de tempo. O mesmo efeito foi avaliado em extratos de batata armazenados.

Para tal, amostras de batata Asterix inteira e triturada foram armazenadas por dois meses em freezer à temperatura de -20 °C. Após este período, essas amostras foram submetidas aos processos de fortificação e extração (ESL-PBT), descritos respectivamente nos itens 2.2.1 e 2.5. Os extratos obtidos foram analisados e quantificados, por CG-DCE empregando-se as condições descritas no item 2.4 e curvas analíticas construídas com padrões preparados em acetonitrila (item 2.4.1).

Simultaneamente, extratos incolores e amarelados obtidos das batatas Monalisa e Asterix, respectivamente, armazenados por sete e dois meses, sob as mesmas condições das batatas inteiras, foram novamente analisados.

As porcentagens de extração obtidas para os quatro agrotóxicos em estudo, nos extratos da batata e extratos armazenados, foram utilizadas para avaliar o efeito da matriz na análise cromatográfica após diferentes tempos e formas físicas de estocagem das batatas.

## **2.7. Aplicação da metodologia otimizada em amostras de batata da região Sul do estado de Minas Gerais e do comércio de Viçosa-MG**

A metodologia ESL-PBT, desenvolvida para determinação dos inseticidas clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em tubérculos, foi aplicada em sete amostras de batata, coletadas em lavouras da região Sul do estado de Minas Gerais, que receberam a aplicação dos produtos comerciais, Astro e Actara. Estes apresentam em suas formulações os princípios ativos, clorpirifós e cipermetrina, respectivamente. Também foram analisadas duas amostras de tubérculos adquiridas no comércio local da cidade de Viçosa-MG.

Após o recebimento das amostras, as mesmas foram acondicionadas em sacos plásticos, vedadas, identificadas e conservadas em freezer. No momento da extração as amostras foram deixadas à temperatura do ambiente até descongelarem. Em seguida, as batatas foram trituradas sem lavar (casca + polpa), até que uma massa homogênea fosse obtida. Alíquotas de 3,000 g foram retiradas e submetidas ao processo de extração, os extratos obtidos foram analisados no CG-DCE. Todas as análises foram realizadas em triplicatas, tomando-se cuidado especial na limpeza do material utilizado. Vidrarias e o multiprocessador doméstico foram lavados com detergente, água corrente, água destilada e acetona, aplicada com o auxílio de uma pisseta, após a trituração de cada amostra.

O restante das amostras processadas foi acondicionado em recipientes plásticos, identificado e armazenado à temperatura de -20 °C, para eventual necessidade de repetição do processo.

### **2.7.1. Aplicação da metodologia otimizada em partes isoladas da batata**

Amostras de batata com a presença de resíduos de clorpirifós, selecionadas a partir dos resultados obtidos no item 2.7, foram descascadas sem lavar e analisadas individualmente a polpa e a casca. Alíquotas de 3,000 g

da polpa homogeneizada (triturada) foram submetidas ao procedimento de extração, seguindo as condições descritas no item 2.5.

Aproximadamente 65,5 g de cascas foram trituradas com o auxílio de 50,0 mL de água destilada. À 3,000 g de casca moída, foi adicionado a mistura extratora otimizada para a técnica ESL-PBT e realizado o procedimento de extração conforme descrito no item 2.5.

### **2.7.2. Comportamento dos resíduos de clorpirifós em batata após cozimento**

A partir dos resultados do item 2.7, foi avaliado o comportamento do pesticida clorpirifós em amostras de batata após o cozimento das mesmas.

Para tal, 3 a 4 batatas médias com a presença do organofosforado clorpirifós foram cozidas inteiras sem lavar e com casca, em 1000,0 mL de água destilada. Posteriormente, foram separadas casca, polpa e água do cozimento as quais foram submetidas aos processos:

**Polpa:** 3,000 g de polpa cozida e triturada foram submetidas ao processo de ESL-PBT otimizado.

**Casca:** Aproximadamente 35,4 g de casca foram trituradas com 50,0 mL de água destilada. A 3,000 g dessa mistura, foram adicionados 1,0 mL de água, 6,5 mL de acetonitrila e 2,5 mL de acetato de etila e submetidas à ESL-PBT.

**Água:** A água do cozimento foi levada à secura em evaporador rotatório a aproximadamente 90 °C e recuperada em 25,0 mL de água destilada. Alíquotas de 4,5 mL foram retiradas e extraídas com 6,5 mL de acetonitrila e 2,5 mL de acetato de etila, seguida de 10 minutos de sonicação. As etapas de congelamento e passagem por papel de filtro com sulfato de sódio anidro foram as mesmas utilizadas no item 2.5.

Este procedimento foi realizado em duas diferentes variedades de batata.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Caracterização das amostras de batata**

Durante a etapa de otimização e validação da técnica ESL-PBT em tubérculos, foram realizadas análises de extratos (brancos) obtidos de batatas testemunhas, ou seja, de amostras que não receberam nenhuma aplicação de agrotóxicos durante o seu desenvolvimento. Desta maneira, certificou-se a ausência de qualquer espécie que pudesse interferir na análise cromatográfica, estando a amostra adequada para avaliação do método proposto.

Posteriormente, na etapa de aplicação da metodologia otimizada, foram coletadas amostras de:

a) batatas de lavouras localizadas no Sul de Minas Gerais, em que houve a aplicação de produtos comerciais contendo como princípios ativos agrotóxicos em estudo. Obteve-se um total de sete amostras de batatas de cinco produtores diferentes.

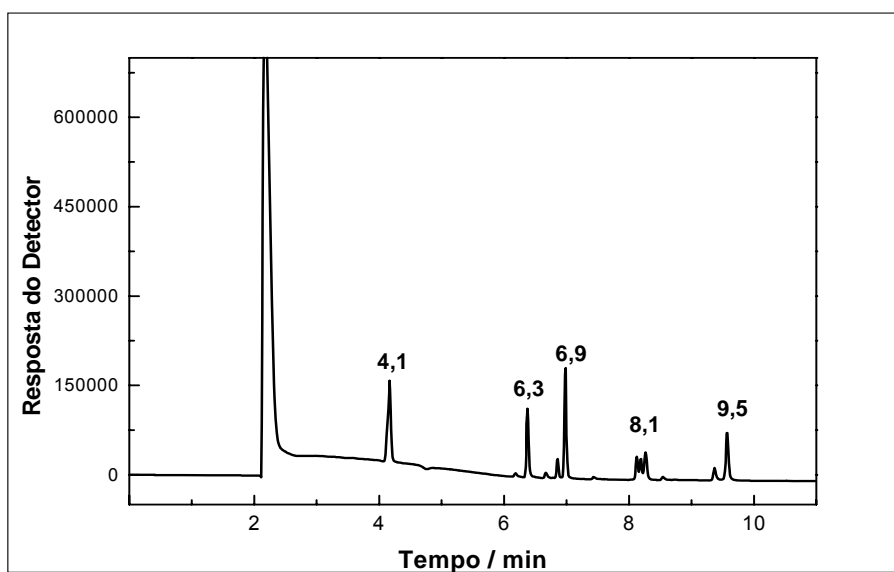
b) batatas disponíveis no comércio da cidade de Viçosa-MG.

### **3.2. Análise cromatográfica**

A cromatografia gasosa é uma técnica de alto poder de resolução, o que torna possível, realizar simultaneamente a separação, a identificação e quantificação de compostos de interesse ambiental, tais como os agrotóxicos presentes em uma mesma amostra (GALLI et al., 2006).

Os inseticidas estudados foram identificados na análise cromatográfica, pela comparação do tempo de retenção ( $t_R$ ) dos picos de seus respectivos padrões com os da amostra. A análise dos padrões foi realizada utilizando-se as condições analíticas descritas no item 2.4. Na Figura 6, está representado um cromatograma de uma solução padrão dos inseticidas, em acetonitrila, a  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os picos com  $t_R$  iguais a: 4,1; 6,9; 8,1; e 9,5 minutos correspondem a clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, respectivamente. O segundo pico, com tempo de retenção igual a 6,3 minutos corresponde a bifentrina, padrão interno.

A presença de mais de um pico para cada piretróide está relacionada com a conversão em isômeros durante a injeção no cromatógrafo (MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004). Dessa maneira, foi considerado como o valor da área de cada piretróide, a soma das áreas dos picos dos seus isômeros.



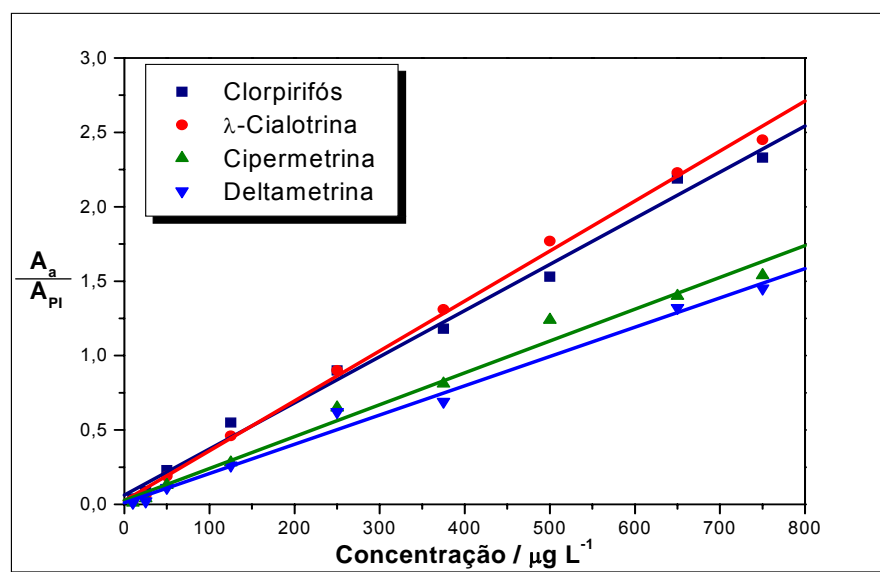
**Figura 6.** Cromatograma de uma solução padrão de  $500,0 \mu\text{g L}^{-1}$  dos princípios ativos em acetonitrila, onde:  $t_R = 6,3$  min: padrão interno,  $t_R = 4,1$  min: clorpirifós,  $t_R = 6,9$  min:  $\lambda$ -cialotrina,  $t_R = 8,1$  min: cipermetrina e  $t_R = 9,5$  min: deltametrina.

Pelo cromatograma, Figura 6, observa-se que o tempo total de análise foi de 11 minutos, que pode ser considerado relativamente curto, pela

quantidade de agrotóxicos analisados. Além disso, as condições estabelecidas, como a programação de temperatura, coluna utilizada e a vazão do gás de arraste, possibilitaram uma boa separação dos compostos estudados.

### 3.2.1. Curvas analíticas e linearidade de resposta do detector

A quantificação dos quatro agrotóxicos foi realizada pelo método do padrão interno. Dessa forma, após a análise das soluções padrão preparadas em solvente puro em concentrações entre 10,0 e 750,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , foram construídas curvas analíticas para cada um dos compostos, lançando no gráfico a razão entre a área do pico do composto de interesse e a área do pico do padrão interno ( $A_a/A_{PI}$ ), contra a concentração de cada pesticida (Figura 7).



**Figura 7.** Curvas analíticas dos agrotóxicos clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina utilizando como padrão interno (PI) a bifentrina, construídas com soluções padrão preparadas em solvente puro.

A linearidade da resposta do detector utilizado (DCE-detector por captura de elétrons) foi verificada com a regressão linear dos dados das curvas analíticas (Tabela 6).

**Tabela 6.** Parâmetros das curvas analíticas obtidas para os quatros agrotóxicos estudados.

Pesticida	Equação da reta	Coefficiente de determinação (r)
Clorpirifós	$y = 0,00310 x + 0,06280$	0,99634
$\lambda$ -Cialotrina	$y = 0,00336 x + 0,02451$	0,99866
Cipermetrina	$y = 0,00214 x - 0,02705$	0,99298
Deltametrina	$y = 0,00197 x - 0,01031$	0,99527

Os coeficientes de determinação (r) maiores que 0,99, apresentados na Tabela 6, indicam que existe uma resposta linear do detector (DCE) na faixa de de 10,0 a 750,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , para todos os compostos. A linearidade determina a região da curva analítica em que há relação direta sinal/concentração.

Além disso, pode-se notar pela inclinação das retas (Figura 7) e pelo coeficiente angular das curvas analíticas que o detector por captura de elétrons (DCE) é mais sensível a  $\lambda$ -cialotrina e ao clorpirifós, que aos outros dois compostos. Esta sensibilidade está relacionada com a presença e a quantidade de átomos eletronegativos que capturam elétrons, flúor e cloro, nas moléculas de clorpirifós e  $\lambda$ -cialotrina, respectivamente.

O método do padrão interno mostrou-se bastante útil, pelo fato de que as respostas cromatográficas não foram significativamente afetadas por pequenas variações na temperatura da coluna, na vazão do gás de arraste e no volume de amostra injetada. Este comportamento auxiliou na obtenção de resultados mais precisos, verificados durante a construção das curvas analíticas e na análise dos extratos.

Porém, para que este método funcionasse adequadamente foi necessária a escolha de uma substância que atendesse as características de padrão interno, tais como: ser similar às substâncias a serem quantificadas, ter tempo de retenção próximo aos compostos de interesse, não fazer parte da amostra, ser disponível em elevado grau de pureza e quando cromatografada ter pico resolvido e bem separado das demais substâncias presentes na amostra (RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 1993). O pesticida disponível que atendeu a estes pré-requisitos foi a bifentrina, um piretróide utilizado com

freqüência na proteção de grãos armazenados, que dificilmente seria encontrado em amostras de batata.

### 3.3. Otimização do método ESL-PBT

O aumento da poluição ambiental por meio de metais tóxicos e principalmente por resíduos de agrotóxicos, das mais variadas classes químicas, tem estimulado o desenvolvimento de metodologias apropriadas para avaliação destes compostos em diferentes tipos de alimentos e bebidas em geral, pois estes são os principais caminhos de ingestão destes contaminantes pelo homem (GALLI et al., 2006). Para a análise de resíduos de agrotóxicos por cromatografia gasosa, há a necessidade que os mesmos sejam extraídos da matriz e que o extrato obtido contenha a menor quantidade possível de interferentes.

Na extração de resíduos de agrotóxicos de amostras complexas, a extração em fase única com a partição induzida pelo abaixamento de temperatura tem se destacado. LENTZA-RIZOS et al.(2001), GOULART (2004) e VIEIRA (2005, 2007), empregaram-na em óleo de oliva, leite, solo e água, respectivamente.

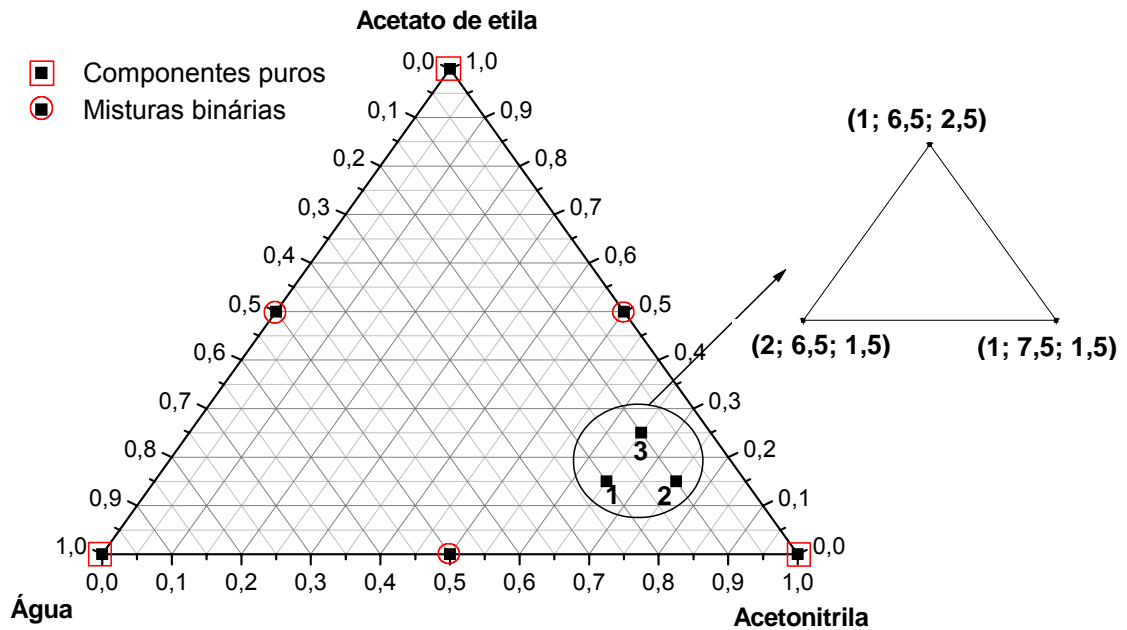
Devido aos ótimos resultados obtidos por estes pesquisadores, foi desenvolvida e otimizada neste trabalho uma metodologia utilizando ESL-PBT, para determinar os inseticidas clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em batatas (*Solanum tuberosum* L.). Esta consiste em adicionar à amostra contendo os analitos de interesse uma quantidade de solvente orgânico miscível em água, formando uma fase única, para que com o abaixamento da temperatura a aproximadamente -20 °C ocorra a separação das fases, em que a batata e a água tornam-se sólidas (congeladas) na parte inferior do recipiente utilizado e o solvente contendo os resíduos de agrotóxicos extraídos permaneçam na parte superior. Durante o estudo da técnica, fatores importantes e influenciadores na sua eficiência, tais como: mistura extratora

ideal, tempo de extração e tipo de congelamento, foram avaliados. Os resultados obtidos serão descritos a seguir.

### 3.3.1. Planejamento experimental para escolha da mistura extratora

Em 2005, VIEIRA, otimizou e validou as técnicas ELL-PBT (extração líquido-líquido por partição em baixa temperatura) e ESL-PBT (extração sólido-líquido por partição em baixa temperatura), para análise de quatro piretróides em água e solo. Durante o trabalho foi observado que a proporção do volume de acetonitrila, água e acetato de etila na etapa de extração influenciava na porcentagem de recuperação dos agrotóxicos.

Neste sentido, foram realizados neste trabalho testes, através de um planejamento experimental de misturas extratoras a fim de se estabelecer a proporção ideal entre o volume de água, acetonitrila e acetato de etila que alcançasse a melhor porcentagem de extração dos inseticidas em batata, pela técnica ESL-PBT. Assim, evitou-se trabalhar com os pontos do “simplex” correspondente aos solventes puros e as misturas binárias (Figura 8), já que o acetato de etila deveria favorecer a extração dos compostos mais lipofílicos, a acetonitrila a extração do clorpirifós e a água, que é indispensável ao princípio da técnica. Na Figura 8, está representado, por meio de um triângulo equilátero, o planejamento experimental das misturas extratoras, destacando a região estudada em função das proporções volumétricas de cada componente, determinadas pelos limites inferiores e superiores de cada solvente na mistura extratora.



**Figura 8.** Espaço experimental das três variáveis da mistura extratora.

Por isso, trabalhou-se com pseudocomponentes, isto é, misturas dos componentes propriamente ditos, ficando o experimento limitado a uma sub-região do “simplex” (Figura 8) pelos limites inferiores e superiores de cada uma das variáveis (item 2.3.1.1).

Os pseudocomponentes ( $z_i$ ) são gerados a partir dos componentes originais pela expressão:

$$z_i = \frac{x_i - I_i}{1 - L} \quad L = \sum_{i=1}^q I_i < 1$$

$x_i$  = proporção do componente puro     $I$  = limite inferior     $i = 1, 2, 3 \dots, q$  sendo portanto uma espécie de codificação (BARROS NETO et al., 1996).

Assim, por exemplo, a mistura 1 com proporções 20; 65; e 15 % dos solventes água, acetonitrila e acetato de etila, respectivamente, corresponde o pseudocomponente de composição (1, 0, 0):

$$z_{H_2O} = \frac{20 - 10}{100 - 90} = 1 \quad z_{MeCN} = \frac{65 - 65}{100 - 90} = 0 \quad z_{EtAc} = \frac{15 - 15}{100 - 90} = 0$$

Na Tabela 7 estão apresentadas as proporções de cada mistura descrita no item 2.3.1, tanto em termos dos componentes puros quanto em termos dos pseudocomponentes, juntamente com as porcentagens de recuperação médias

da extração dos inseticidas de batatas, que foram determinadas a partir de triplicatas realizadas para cada mistura.

**Tabela 7.** Composição das misturas extratoras: água, acetonitrila e acetato de etila, em valores reais dos componentes ( $c_i$ ) e em pseudocomponentes ( $z_i$ ) e as porcentagens de recuperação médias dos agrotóxicos em amostras de batatas.

Mistura	$C_{H_2O}$	$C_{MeCN}$	$C_{EtAc}$	$Z_{H_2O}$	$Z_{MeCN}$	$Z_{EtAc}$
1	2,0	6,5	1,5	1	0	0
2	1,0	7,5	1,5	0	1	0
3	1,0	6,5	2,5	0	0	1

\* Recuperação (%)  $\pm$  estimativa do desvio padrão

Mistura	Clorpirifós	$\lambda$ -Cialotrina	Cipermetrina	Deltametrina
1	80,1 $\pm$ 1,2	77,8 $\pm$ 2,6	66,0 $\pm$ 2,8	80,6 $\pm$ 2,6
2	88,5 $\pm$ 0,9	82,3 $\pm$ 1,4	68,4 $\pm$ 0,3	83,9 $\pm$ 1,6
3	78,5 $\pm$ 1,2	86,7 $\pm$ 0,4	77,6 $\pm$ 1,3	91,7 $\pm$ 1,1

\* Média de três replicatas.

O conjunto de respostas obtido para cada pesticida (Tabela 7), foi ajustado a um modelo polinomial linear, usando o método dos mínimos quadrados, ( $Y(z_1, z_2, \dots, z_q) = b_1z_1 + b_2z_2 + \dots + b_qz_q$ ) (BARROS NETO et al., 1996).

Este ajuste foi obtido com o auxílio do programa Statistica 6.0<sup>®</sup> (StatSoft), que também fornece a tabela da análise de variância (Tabela 8) que permite avaliar a qualidade do ajuste.

**Tabela 8.** Análise de variância para o ajuste do modelo linear às respostas obtidas do planejamento de mistura para ESL-PBT.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº de graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F
Clorpirifós				
Regressão	160,3	2	80,1	
Resíduos	7,5	6	1,3	64,0*
Total	167,8	8		
$\lambda$ -Cialotrina				
Regressão	120,2	2	60,1	
Resíduos	18,1	6	3,0	20,0*
Total	138,3	8		
Cipermetrina				
Regressão	224,0	2	112,0	
Resíduos	18,9	6	3,2	35,5*
Total	243,0	8		
Deltametrina				
Regressão	195,7	2	97,9	
Resíduos	20,9	6	3,5	28,1*
Total	216,7	8		
* significativo ao nível de 95 % de probabilidade pelo teste F( $F_{\text{tab}} = F_{2,6} = 5,14$ )				
	Clorpirifós	$\lambda$ -Cialotrina	Cipermetrina	Deltametrina
% de variância explicada	95,5	87,0	92,2	90,3

Os valores do teste F indicam que as regressões foram significativas ao nível de 95 % de probabilidade para todos os inseticidas e que, portanto existem coeficientes significativos no modelo para o clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina. Tais modelos encontram-se na Tabela 9, em que é mostrado também o erro padrão de cada estimativa. Pois, o teste F do modelo na análise de variância não especifica qual ou quais coeficientes são mais importantes. Os valores dos coeficientes representam a contribuição de cada pseudocomponente na extração dos agrotóxicos. Como o que se deseja é maximizar a porcentagem de recuperação dos agrotóxicos da amostra, a

mistura que forma o pseudocomponente relacionado ao coeficiente de maior valor deve ser a escolhida.

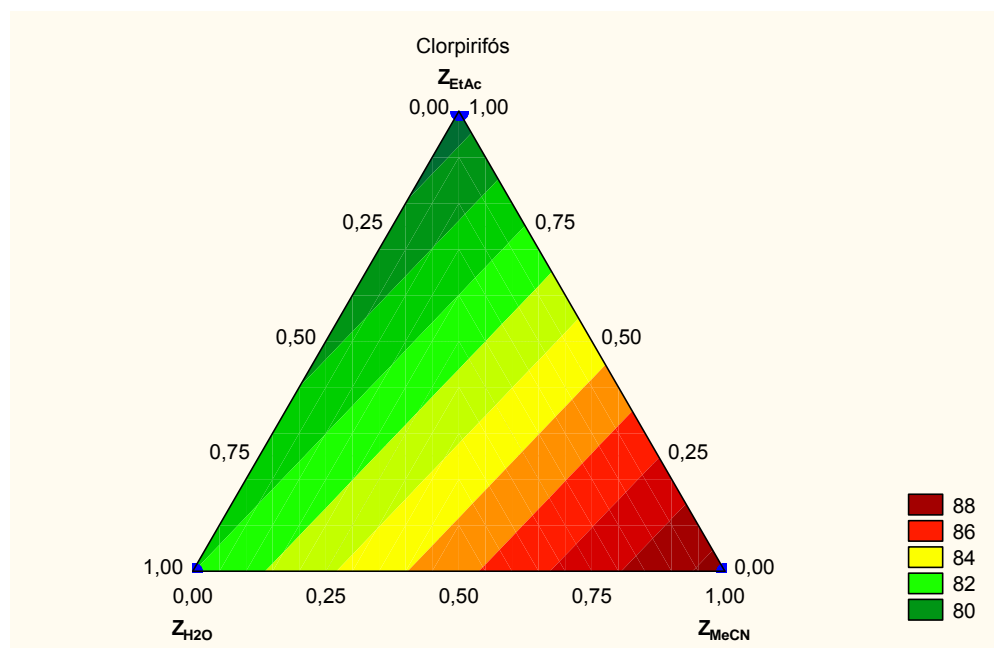
**Tabela 9.** Coeficientes do modelo linear estimados para cada pesticida.

Agrotóxicos	Coeficientes do modelo		
	b <sub>1</sub>	b <sub>2</sub>	b <sub>3</sub>
Clorpirifós	81,0* (± 0,7)	88,5* (± 0,7)	78,5* (± 0,7)
λ-Cialotrina	77,8* (± 1,0)	82,3* (± 1,0)	86,7* (± 1,0)
Cipermetrina	66,0* (± 1,0)	68,4* (± 1,0)	77,6* (± 1,0)
Deltametrina	80,6* (± 1,1)	83,9* (± 1,1)	91,7* (± 1,1)

(±) = erros padrão dos coeficientes, \*coeficiente estatisticamente significativo a 95 % de probabilidade.

Pode-se observar (Tabela 9) que os valores entre parênteses (erros padrão dos coeficientes) são muito menores que os valores das estimativas mostrando que os três coeficientes são estatisticamente significativos para todos os inseticidas.

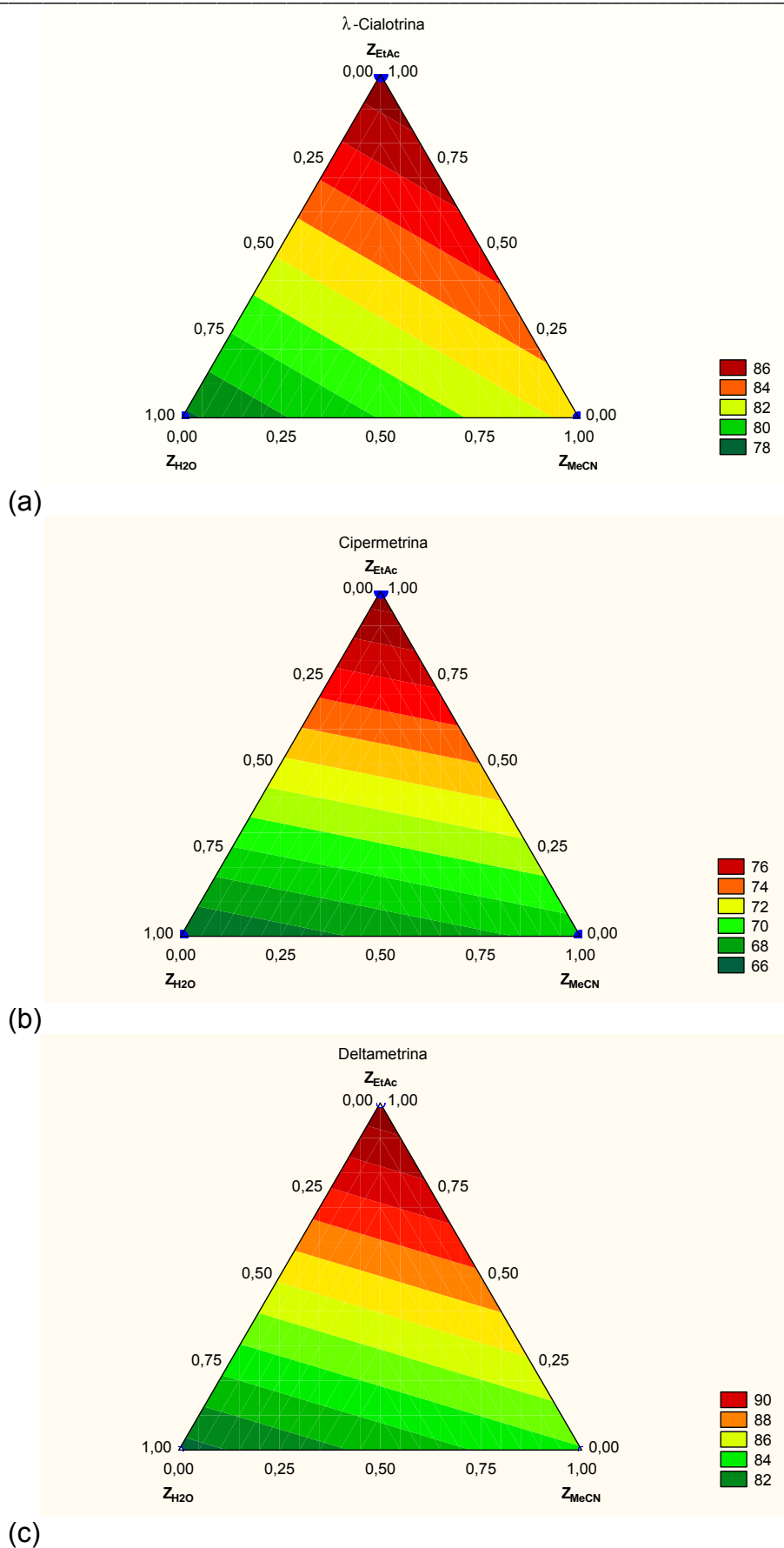
Porém, para o clorpirifós, nota-se que o coeficiente que indica o pseudocomponente 2 puro, que é constituído por 1,0 mL de água, 7,5 mL de acetonitrila e 1,5 mL de acetato de etila, forneceu uma melhor extração. Este comportamento pode ser melhor visualizado na superfície de resposta apresentada na Figura 9.



**Figura 9.** Superfície de resposta mostrando a estimativa da porcentagem de recuperação para o clorpirifós em função dos pseudocomponentes.

Nota-se na região vermelha escura da Figura 9, referente ao ponto 2, que cerca de 88 % do clorpirifós foi recuperado de amostras de batata fortificadas.

Para os piretróides, a melhor resposta foi obtida com o pseudocomponente 3 puro, constituído por 1,0 mL de água, 6,5 mL de acetonitrila e 2,5 mL de acetato de etila. Na Figura 10 a região vermelha escura mostra as porcentagens de recuperação alcançadas quando empregado o pseudocomponente 3, cerca de 86 % para a  $\lambda$ -cialotrina, 76 % para a cipermetrina e 90 % para a deltametrina.



**Figura 10.** Superfícies de resposta para (a)  $\lambda$ -cialotrina, (b) cipermetrina e (c) deltametrina, mostrando as estimativas das porcentagens de recuperação dos respectivos compostos em função dos pseudocomponentes.

Pela análise geral dos dados apresentados na Tabela 7 e nas Figuras 9 e 10, pode-se observar que os piretróides ( $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina, deltametrina), que são compostos menos polares, têm maiores porcentagens de recuperação com a mistura extratora 3, que é mais rica em acetado de etila. Por outro lado o clorpirifós tem a sua porcentagem de recuperação prejudicada pela diminuição da polaridade da mistura extratora. O aumento da proporção de acetonitrila contribui para uma melhor extração deste composto da batata, como observado no resultado obtido com a mistura 2.

Apesar das porcentagens de recuperação apresentadas estarem de acordo com os valores sugeridos pelo GARP (1999), de 70 a 120 %, procurou-se melhorar os resultados verificando-se o comportamento das misturas extratoras pela adição de sal, alterando assim a força iônica do meio.

### 3.3.2. Avaliação da força iônica na eficiência da extração

A adição de um sal às amostras tem se mostrado útil para melhorar a eficiência da extração. Em geral, o aumento da força iônica provoca a redução da solubilidade do analito na matriz, facilitando a sua extração (LANÇAS, 2004).

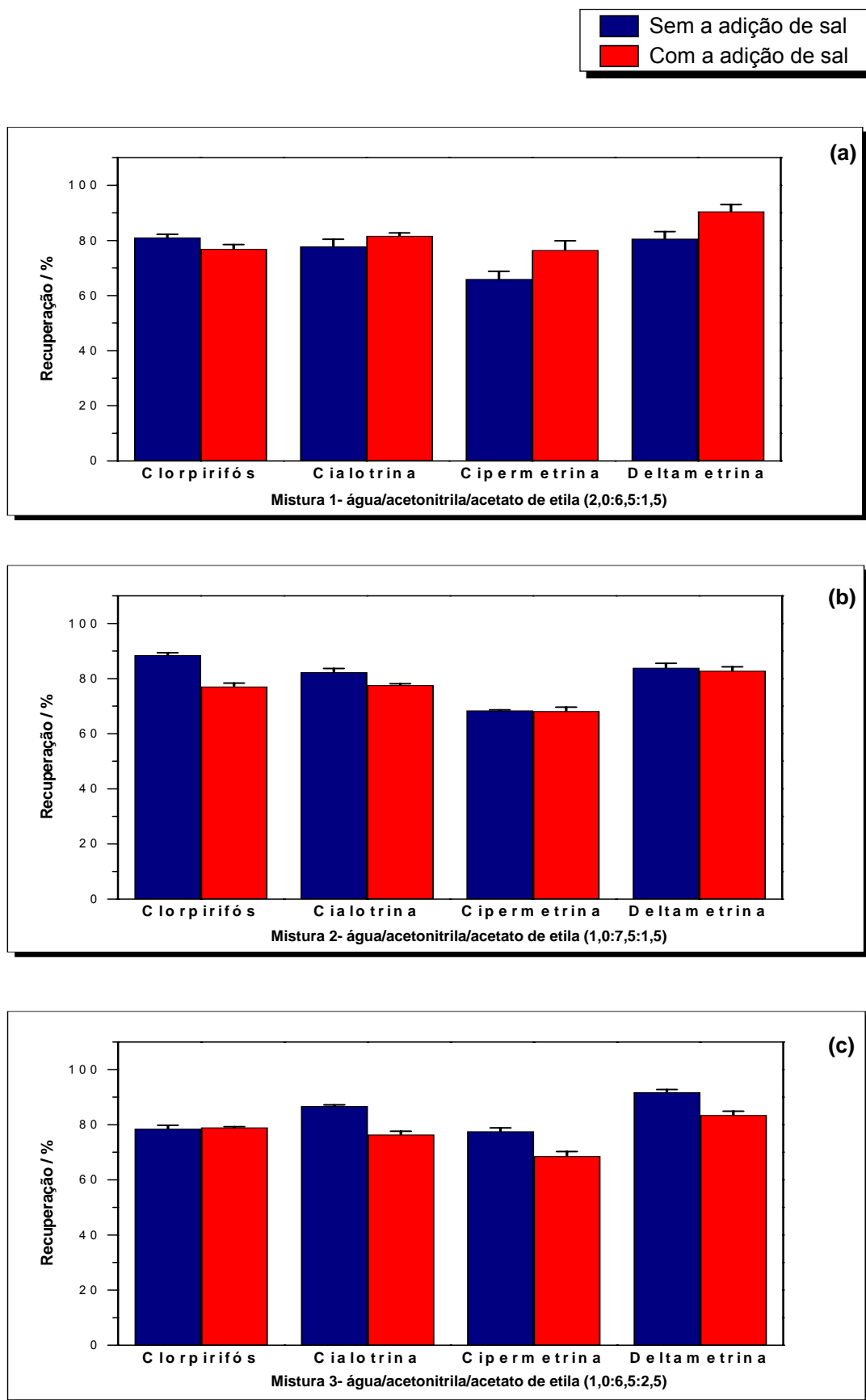
Em 2003, OVIEDO et al., analisaram resíduos de cipermetrina, deltametrina e permetrina em diversas hortaliças como, alface, acelga, chicória, repolho, tomate, chuchu, batata, cenoura, mandioca, através de uma extração sólido-líquido, seguida de um “clean up” em coluna de Florisil. O uso de uma solução de NaCl 3 % (m/v), na etapa de extração, aumentou a recuperação dos piretróides para valores acima de 80 %.

Já, LAMBROPOULOU & ALBANIS (2002), observaram um efeito positivo da força iônica ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) para análise de sete agrotóxicos organofosforados em amostras de morango e cereja por MEFS/headspace.

Desta maneira, no desenvolvimento de um método analítico é recomendável avaliar o efeito da adição de sal no procedimento. Nesse trabalho, a avaliação da força iônica na eficiência de extração dos inseticidas de batata foi realizada conforme o procedimento descrito no item 2.3.1.2.

---

Na Figura 11, são mostrados os resultados das análises realizadas com as misturas extratoras 1, 2 e 3 com a ausência e a presença de uma solução aquosa de NaCl  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , para alterar a força iônica.



**Figura 11.** Porcentagens média de recuperação dos inseticidas obtidas com o emprego da mistura extratora (a) 1 (b) 2 e (c) 3 sem e com a adição de sal, pela ESL-PBT.

Pode-se observar que, de acordo com a Figura 11, a adição de sal alterando a força iônica do meio aumentou o rendimento de extração da  $\lambda$ -cialotrina, da cipermetrina e da deltametrina, de 77,8 para 81,6 %, de 66,0 para 76,5 % e 80,6 para 90,5 %, respectivamente, quando a mistura 1 foi empregada. Entretanto, a eficiência da extração do clorpirifós não foi praticamente alterada. Foi observado durante o procedimento que a presença de sal nesta mistura favorece a ruptura das fases.

A adição de sal nas misturas 2 e 3 não influenciou positivamente a recuperação dos agrotóxicos.

Possivelmente o maior volume da solução de NaCl na mistura 1 em relação as misturas 2 e 3, pode ter favorecido a extração dos piretróides.

Logo, como a força iônica não alterou as taxas de recuperação dos compostos da maneira esperada, já que a solvatação dos íons sódio e cloro pelas moléculas de água, deveria facilitar a migração dos inseticidas para a fase orgânica, este fator foi desprezado para os testes seguintes.

### **3.3.3. Deslocamento no planejamento da mistura extratora**

Com o objetivo de se obter porcentagens de recuperação ainda melhores para o método, optou-se nesta etapa do trabalho, em deslocar o planejamento de misturas, realizando-se testes com duas novas proporções de água, acetonitrila e acetato de etila, escolhidas no simplex ternário a partir dos resultados dos experimentos iniciais.

Na Tabela 10, estão apresentadas as porcentagens de recuperação dos quatro compostos estudados, após a extração dos inseticidas das amostras de batata fortificadas, com as novas proporções dos solventes avaliados (misturas 4 e 5 - item 2.3.1.3). Para análise de todo o planejamento de mistura realizado foram apresentados também nesta tabela os resultados obtidos no primeiro planejamento (item 2.3.1.1).

**Tabela 10.** Porcentagens de recuperação dos inseticidas de amostras de batatas, obtidas com o planejamento de misturas para ESL-PBT.

Mistura	Recuperação (%) $\pm$ estimativa do desvio padrão			
	Clorpirifós	$\lambda$ -Cialotrina	Cipermetrina	Deltametrina
1	81,0 $\pm$ 1,2	77,8 $\pm$ 2,6	66,0 $\pm$ 2,8	80,6 $\pm$ 2,6
2	88,5 $\pm$ 0,9	82,3 $\pm$ 1,4	68,4 $\pm$ 0,3	83,9 $\pm$ 1,6
3	78,5 $\pm$ 1,2	86,7 $\pm$ 0,4	77,6 $\pm$ 1,3	91,7 $\pm$ 1,1
4	90,3 $\pm$ 3,5	83,2 $\pm$ 3,8	76,2 $\pm$ 2,2	94,5 $\pm$ 3,2
5	91,0 $\pm$ 1,1	86,7 $\pm$ 0,4	81,0 $\pm$ 2,4	103,6 $\pm$ 2,8

De uma maneira geral, as misturas 3, 4 e 5, apresentaram as melhores porcentagens de recuperação média para os princípios ativos estudados, porém para a mistura 4 pôde-se notar que maiores valores de desvio padrão foram obtidos, possivelmente devido a ausência de adição de água nesta mistura, que pode ter influenciado a etapa de separação das fases. Portanto, foram escolhidas para os testes seguintes as misturas 3 e 5, cujos resultados mostraram maior eficiência de extração e menores valores de desvio-padrão.

O deslocamento ao longo do simplex não é um fato muito comum, por isso, outra forma de se interpretar os resultados é considerando um novo planejamento formado pelos pontos 2, 3, 4 e 5. Desta forma os limites inferiores e superiores de cada componente da mistura seriam alterados para:

Limite inferior

Limite superior

$$0 \% \leq \text{Água} \leq 10 \%;$$

$$65 \% \leq \text{Acetonitrila} \leq 75 \%$$

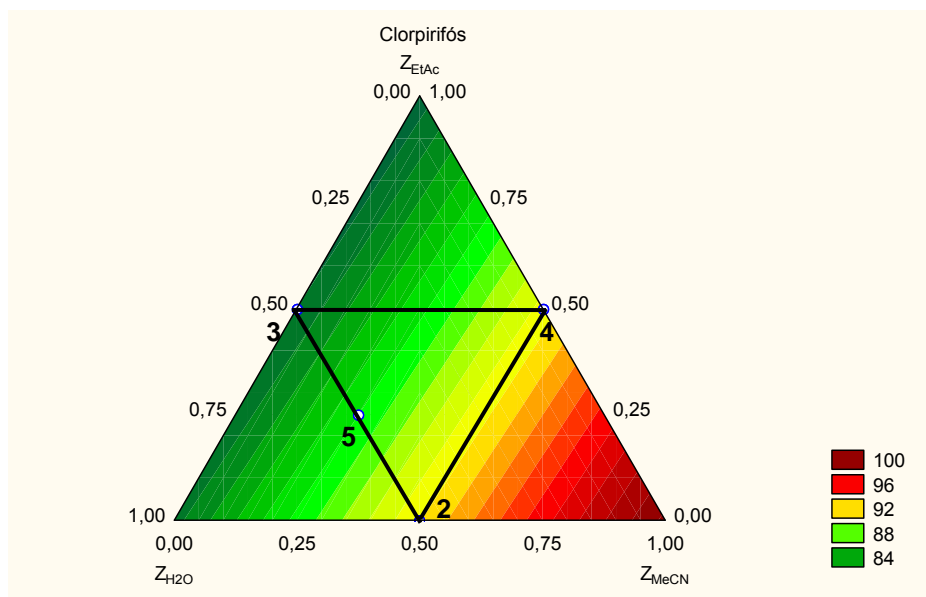
$$15 \% \leq \text{Acetato de etila} \leq 25 \%$$

As proporções obtidas para cada mistura com os novos limites, tanto em termos de componentes puros quanto em pseudocomponentes são apresentadas na Tabela 11.

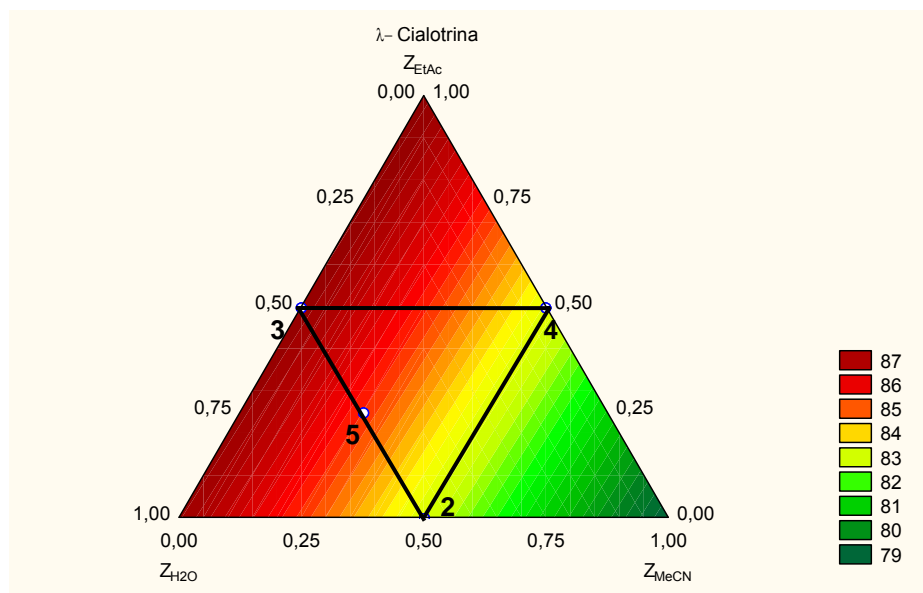
**Tabela 11.** Composição das misturas preparadas com água, acetonitrila e acetato de etila, em valores reais dos componentes ( $c_i$ ) e em pseudocomponentes ( $z_i$ ).

Mistura	$C_{H_2O}$	$C_{MeCN}$	$C_{EtAc}$	$Z_{H_2O}$	$Z_{MeCN}$	$Z_{EtAc}$
2	1,0	7,5	1,5	0,5	0,5	0
3	1,0	6,5	2,5	0,5	0	0,5
4	0	7,5	2,5	0	0,5	0,5
5	1,0	7,0	2,0	0,5	0,25	0,25

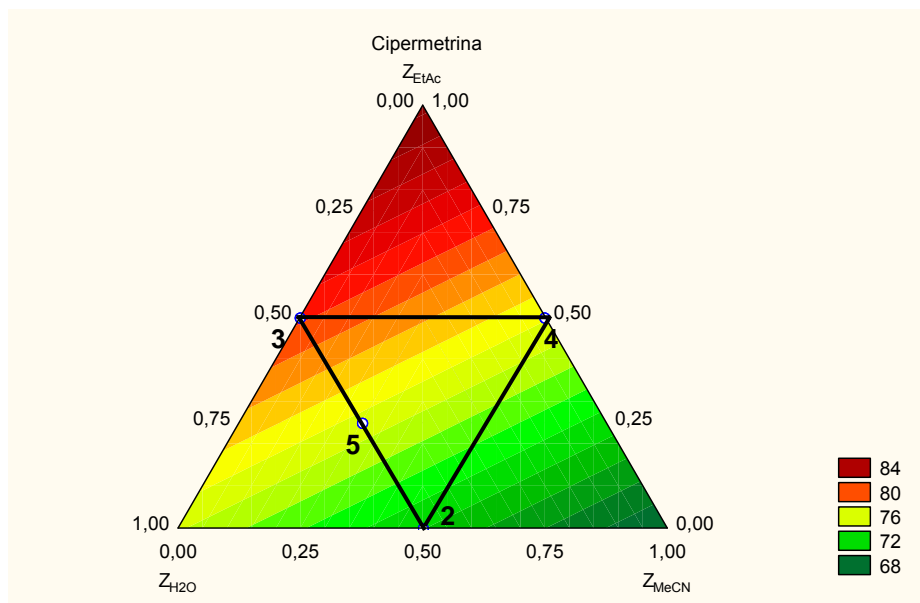
As porcentagens de recuperação apresentadas na Tabela 10 para cada agrotóxico analisado, segundo o novo planejamento, descrito anteriormente, são mostrados nas superfícies da Figura 12.



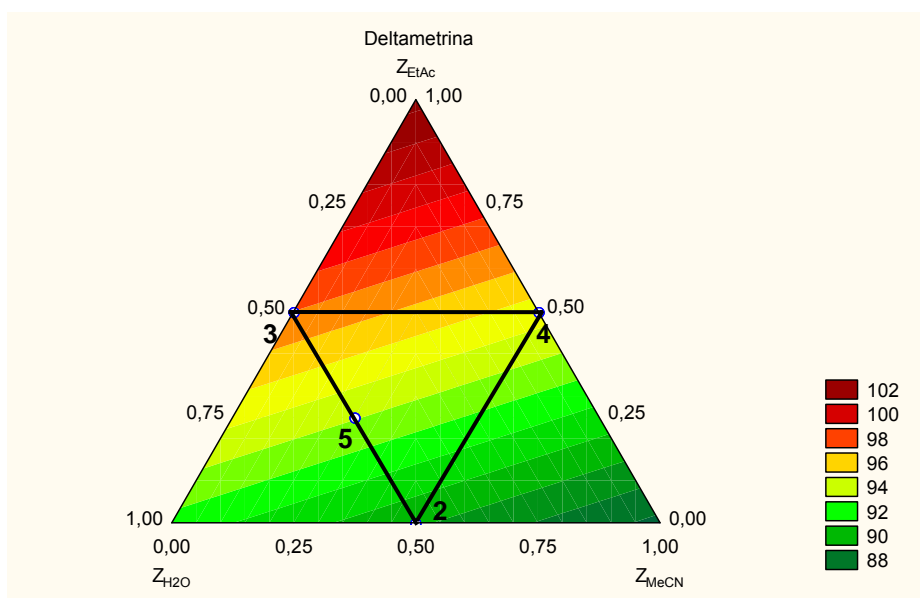
(a) Clorpirifós



(b)  $\lambda$ -Cialotrina



(c) Cipermetrina



(d) Deltametrina

**Figura 12.** Superfícies de resposta para (a) clorpirifós, (b)  $\lambda$ -cialotrina, (c) cipermetrina e (d) deltametrina, segundo o novo planejamento de misturas extratoras.

De acordo com os resultados contidos na Figura 12, pode-se observar que as porcentagens de recuperação mais elevadas (próxima a região vermelha escura) foram obtidas com diferentes misturas para organofosforado e piretróides. Para o clorpirifós, as misturas que apresentaram maiores recuperações foram aquelas com maior quantidade de acetonitrila. Enquanto para os piretróides, as porcentagens de recuperação alcançadas quando utilizado a mistura extratora 3, forneceu melhores porcentagens de recuperação para estes compostos.

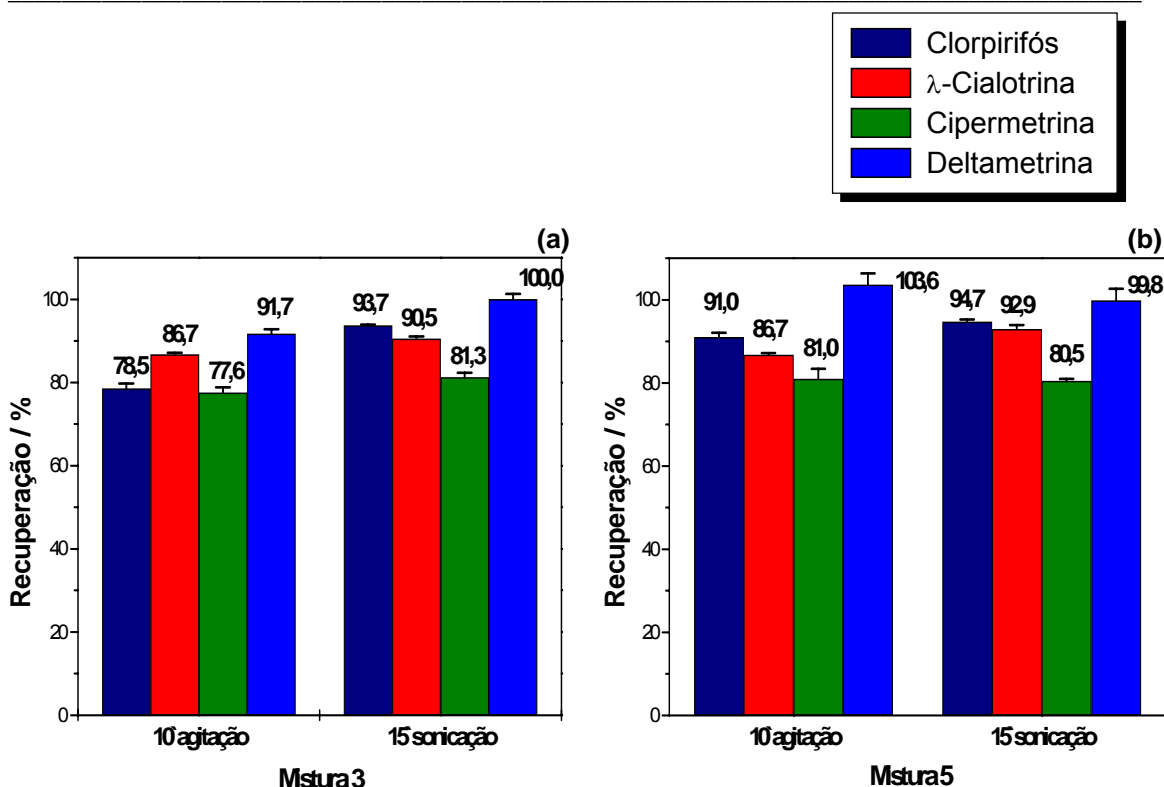
Desta forma, a mistura 3 mostrou-se mais adequada para extração da maioria dos inseticidas, sendo seu comportamento avaliado cautelosamente nos demais ensaios.

#### **3.3.4. Efeito da vibração ultra-sônica**

Os químicos analíticos têm empregado a técnica de sonicação para auxiliar nos processos de agitação e extração (KORN et al., 2005).

Esta alternativa foi avaliada neste estudo no sentido de simplificar a operação de preparo de amostras bem como minimizar erros envolvidos nesta etapa. Para tal, amostras de batata fortificadas foram extraídas durante 15 minutos em banho ultra-sônico, com as misturas de solventes 3 e 5, que mostraram uma maior eficiência de extração com uma menor dispersão dos resultados.

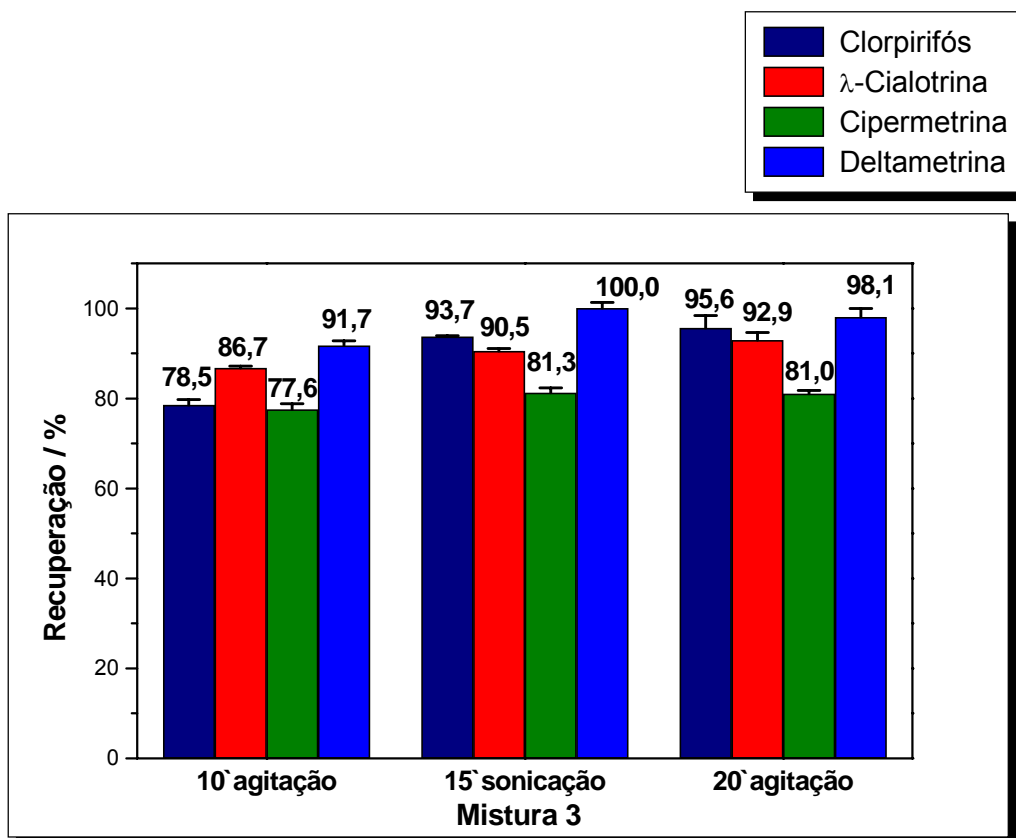
Na Figura 13, estão apresentadas as porcentagens de recuperação dos quatro inseticidas estudados, após extração com 10 minutos de agitação mecânica (planejamento de misturas) e 15 minutos de ultra-som.



**Figura 13.** Porcentagens de recuperação do clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, após extração com 10 minutos de agitação mecânica e 15 minutos de ultra-som (a) - com a mistura extratora 3 (b) - com a mistura extratora 5.

Pode-se observar pelos resultados (Figura 13 (a)) que o emprego do ultra-som com a mistura 3, mostrou-se bastante eficiente para a extração do clorpirifós, que teve um aumento na sua porcentagem de recuperação de 78,5 para 93,7 %. Para os piretróides, este aumento foi menos acentuado, com os resultados variando de 86,7 para 90,5 %, para a  $\lambda$ -cialotrina, 77,6 para 81,3 % para a cipermetrina e de 91,7 para 100,0 %, para a deltametrina. Pequenas alterações também foram observadas quando aplicado o ultra-som com a mistura 5 (Figura 13 (b)).

Para efeito de comparação um novo teste empregando a mistura 3 e 20 minutos de agitação mecânica foi realizado (Figura 14).



**Figura 14.** Comparação das porcentagens de recuperação obtidas com a mistura 3 e 20 minutos de agitação, com os resultados da Figura 13(a).

Com o aumento do tempo de agitação para 20 minutos na mistura 3, conseguiu-se atingir porcentagens de recuperação semelhantes as obtidas com a aplicação de 15 minutos de ultra-som, mas com um desvio padrão maior para média de três repetições. Desta maneira, observou-se que pode influenciar na eficiência do método ESL-PBT, não só a composição da mistura, mas também o tempo de contato entre as fases (matriz e mistura). Neste caso, como o processo de extração por ondas ultra-sônicas ocorre de forma mais brusca, esta técnica permitiu com o uso da mistura 3, que menor intervalo de tempo fosse necessário para uma melhor recuperação dos agrotóxicos de amostras de batatas.

Assim, como ótimas porcentagens de recuperação foram obtidas para os quatro princípios ativos estudados com ambas as misturas e mecanismos de extração, a escolha da combinação ideal, baseou-se nos resultados obtidos com menor dispersão e maior praticidade na etapa de preparo dos extratos, sendo, portanto selecionado para os testes seguintes a mistura 3 e a aplicação

---

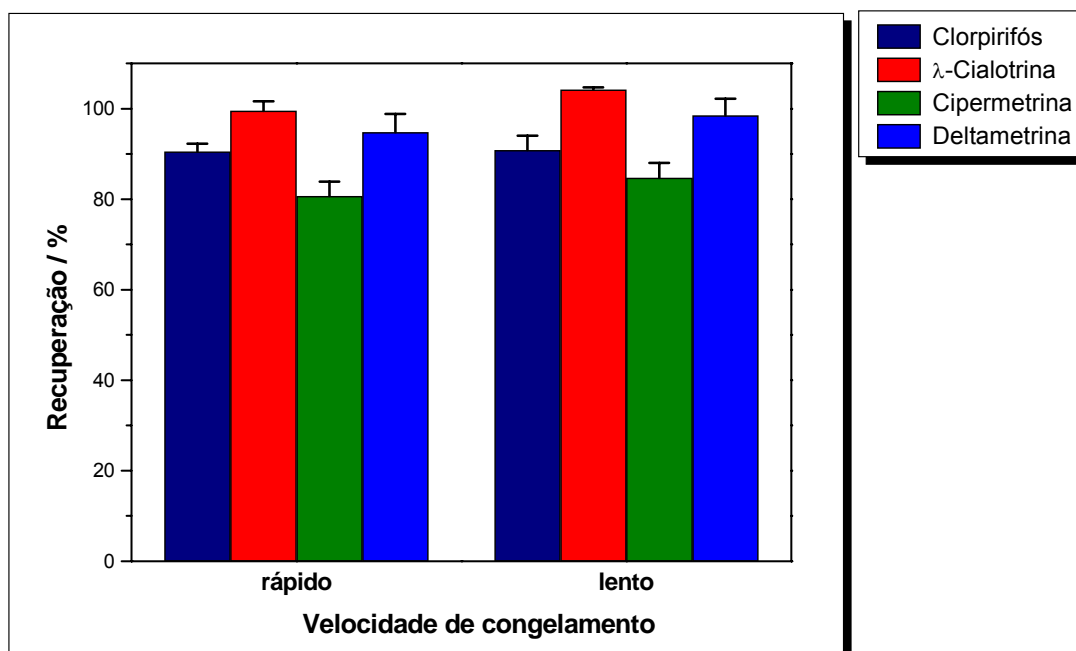
de 15 minutos de ultra som.

Cabe ressaltar que na literatura são citados vários parâmetros que podem influenciar as respostas obtidas com o uso de banhos ultra-sônicos, tais como: volume e temperatura da água utilizada dentro do banho, posição e número de frascos no interior do banho, dentre outros (NASCENTES et al., 2001). Porém, neste trabalho não foram avaliados o comportamento de tais parâmetros. O banho ultra-som foi utilizado com o número máximo de frascos permitidos, água a temperatura ambiente, nível de água e altura dos frascos conforme recomendado pelo fabricante, não sendo observado nenhum inconveniente, como a degradação dos compostos e alta dispersão das replicatas em torno da média.

### **3.3.5. Avaliação do tipo de congelamento**

A avaliação do efeito do tipo de congelamento das amostras na extração simultânea dos agrotóxicos foi realizada conforme o procedimento descrito no item 2.3.1.5 (pág. 24).

Os resultados obtidos após o congelamento das amostras em duas diferentes condições: em caixas de isopor para proporcionar um congelamento mais lento e em contato direto com a superfície do congelador, resultando em um congelamento mais rápido, estão dispostos na Figura 15.



**Figura 15.** Porcentagens de recuperação do clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, usando a técnica ESL-PBT, após diferentes formas de congelamento.

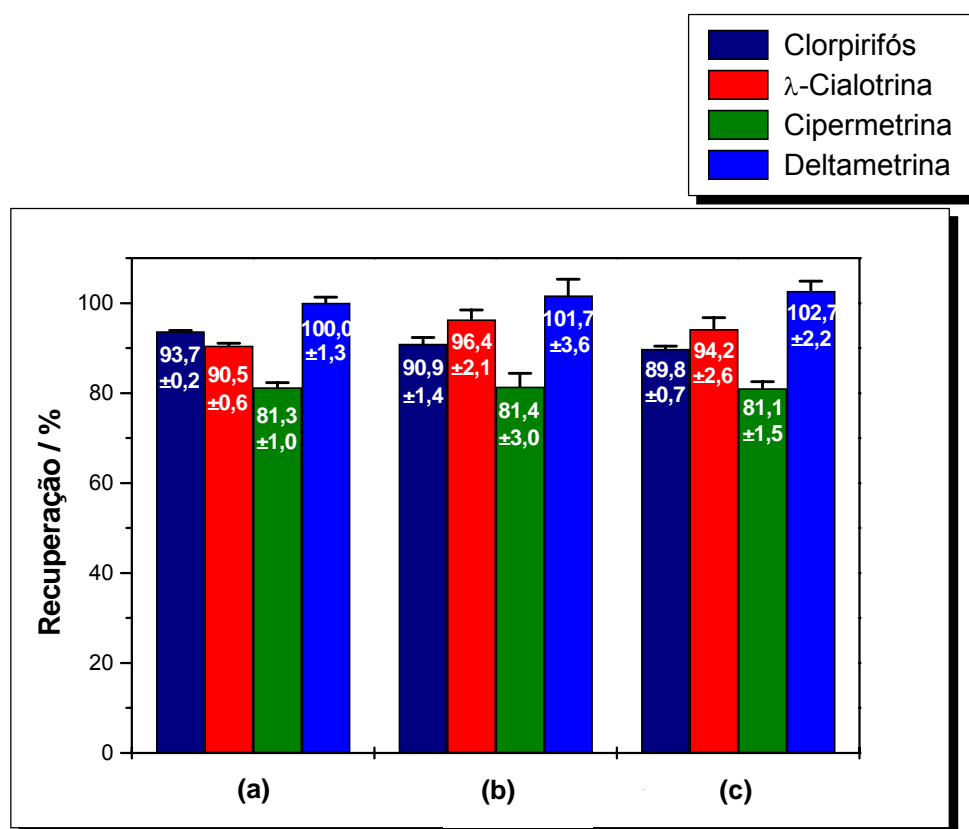
Os resultados obtidos mostram que o tipo de congelamento não influenciou nas porcentagens de recuperação do clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina de batata. Porém, durante a realização desta etapa do experimento, notou-se que quando a separação das fases é induzida por um rápido abaixamento de temperatura (amostras congeladas diretamente no congelador), não ocorre uma cristalização perfeita das moléculas de água, fazendo com que durante a etapa de filtração o calor cedido pelas mãos do analista, acelere o descongelamento da amostra dificultando a realização desta etapa e prejudicando a obtenção dos melhores resultados. Desta forma, um congelamento mais lento é indicado para garantir que melhores porcentagens de recuperação sejam obtidas seguidas de menores valores de desvio padrão.

### 3.3.6. Avaliação da mistura extratora água/acetoneitrila/metanol

ANASTASSIADES et al. (2003) sugerem que solventes como, metanol e etanol, sejam utilizados para aumentar a polaridade das fases orgânicas

utilizadas em métodos multirresíduos. Assim, outro fator avaliado durante este trabalho foi a presença de um solvente mais polar, o metanol, na fase única utilizada na extração.

As porcentagens de recuperação dos quatro compostos estudados, após extração com água, acetonitrila e metanol nas proporções apresentadas na Tabela 4, item 2.3.1.6 (pág. 25), são apresentadas na Figura 16, em comparação com os resultados obtidos quando se utiliza acetato de etila em condições otimizadas.



**Figura 16.** Porcentagens de recuperação do clorpirifós, λ-cialotrina, cipermetrina e deltametrina, usando como misturas extratoras em mL: (a)- água/acetonitrila/acetato de etila (1,0:6,5:2,5), (b) e (c)-água/acetonitrila/metanol (1,0:8,8:0,2 e 1,0:8,5:0,5), respectivamente.

A utilização da proporção água/acetonitrila/metanol (1,0:6,5:2,5) não permitiu o congelamento das amostras, tornando inviável a análise dos extratos para esta mistura.

Comparando-se as porcentagens de recuperação obtidas para os compostos de interesse com a presença de 0,2 e 0,5 mL de metanol na fase única (Figura 16), com os resultados obtidos com o uso da mistura 3 (item 3.3.4), pode-se perceber que a presença de pequenos volumes de metanol não afetou a eficiência da técnica, possivelmente a maior proporção de acetonitrila e o tempo de extração adequado proporcionou as condições ideais para a extração dos compostos.

A tentativa de se obter uma mistura extratora adequada para a técnica ESL-PBT em batatas com característica mais polar, deve-se a possibilidade de tornar a técnica mais abrangente, ou seja, poder analisar compostos com maior diferença de polaridade.

As características dos agrotóxicos analisados não são extremamente divergentes, log Kow entre 5,1 e 7,0 e faixa de solubilidade em água (20 - 25 °C) de 14 a 0,002 mg L<sup>-1</sup>. Isto pode dificultar a incorporação de outros compostos mais polares à metodologia otimizada. Por exemplo, os organofosforados forato e metamidofós, agrotóxicos que também são utilizados na bataticultura, mas que apresentam solubilidade em água de 50 mg L<sup>-1</sup> a 25 °C e >200 g L<sup>-1</sup> (20 °C), respectivamente (WHO, 1990; JUHLER, 1997).

As porcentagens de recuperação obtidas não estão de acordo com VIEIRA (2005), que analisando λ-cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina em água pela técnica ELL-PBT, observou uma queda acentuada na eficiência de extração dos compostos com a adição de pequenos volumes de metanol à mistura extratora.

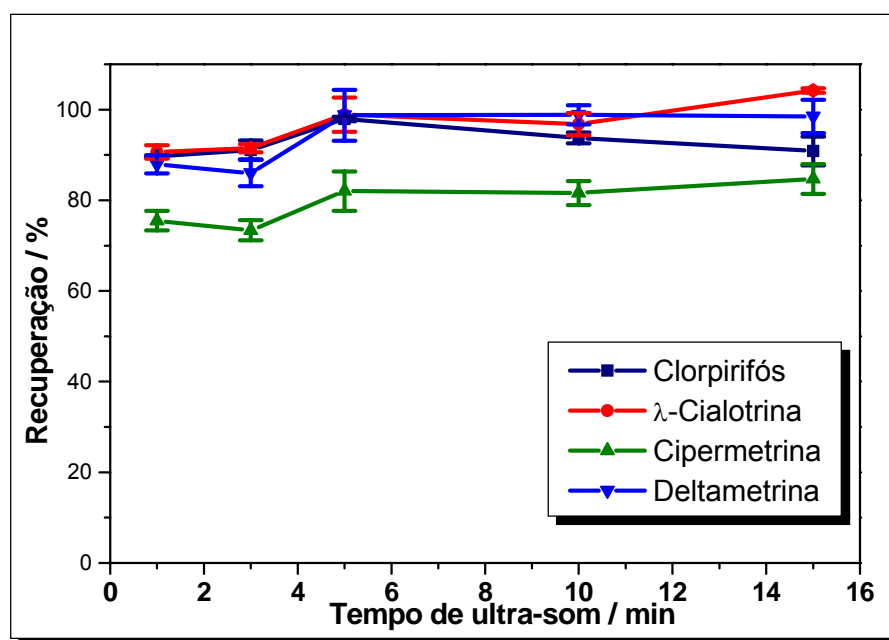
Tal comportamento sugere que as interações pesticida/matriz, variam para matrizes diferentes. Em batatas, possivelmente os inseticidas não sistêmicos, formam um depósito na superfície e são facilmente extraídos. Nesse sentido, AHMED (2001), explica que ainda não há um procedimento analítico único de consenso internacional, para análise multirresíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes, e que os padrões internacionais de publicação estão longe de descrevê-lo. Por isso, que os métodos precisam ser cada vez mais testados e comparados entre diferentes tipos matrizes e laboratórios.

Visando a otimização do método multirresíduo para análise do clorpirifós, λ-cialotrina, cipermetrina e deltametrina, a mistura 3 (água/acetonitrila/acetato de etila 1,0:6,5:2,5) continuou sendo a mais adequada para as análises, pois

embora as porcentagens média de extração dos agrotóxicos não tenham sido afetadas pela presença do metanol na etapa de extração, maiores valores de estimativas dos desvios padrão foram obtidos, permanecendo-se então com uso da mistura água/acetona/acetato de etila. Além disso, o acetato de etila por ser um solvente menos polar arrastou menor quantidade de água para os extratos.

### 3.3.7. Avaliação do tempo de extração

Na avaliação do tempo de extração na eficiência da ESL-PBT, as amostras foram sonicadas durante 1, 3, 5, 10 e 15 minutos conforme o procedimento descrito no item 2.3.1.7. Os dados encontrados estão apresentados na Figura 17.



**Figura 17.** Porcentagens de recuperação do clorpirifós, λ-cialotrina, cipermetrina e deltametrina de batatas, usando a ESL-PBT, com 1, 3, 5, 10 e 15 minutos de sonicação da matriz fortificada.

As porcentagens de recuperação dos inseticidas, em todo o intervalo avaliado foram maiores que 70 %. Pode-se observar um suave aumento nos rendimentos de extração dos quatro princípios ativos até 5 minutos de

sonicação, a partir deste ponto os resultados mostraram-se praticamente constantes.

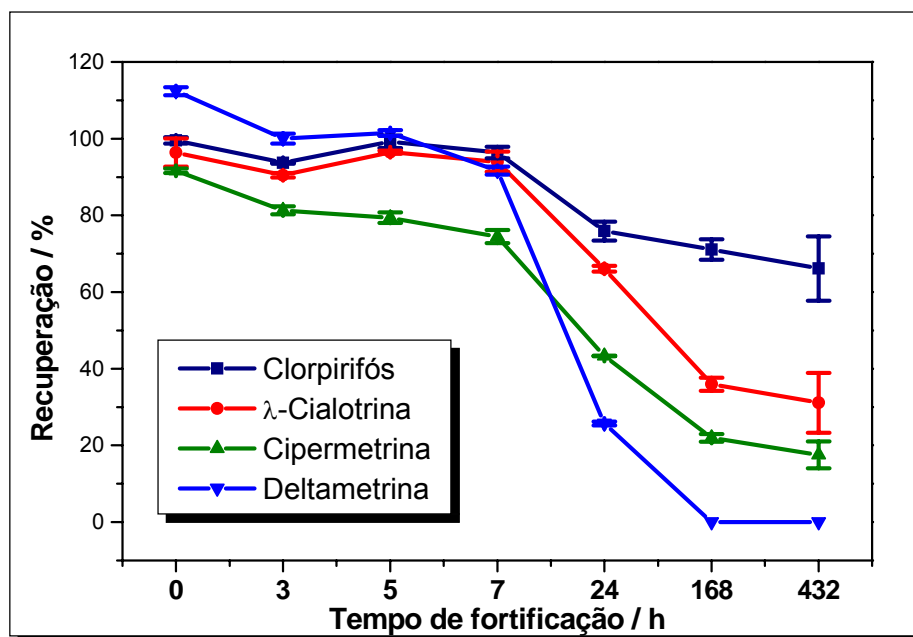
Dos tempos avaliados, 10 minutos foi escolhido como ideal, para garantir a ocorrência de uma melhor extração. Observando-se os resultados obtidos durante este intervalo, nota-se que os rendimentos de extração dos inseticidas em tubérculos, variaram de 89,7 a 93,8 % para o clorpirifós, 90,7 a 96,8 % para a  $\lambda$ -cialotrina, 75,5 a 81,6 % para a cipermetrina e 87,9 a 98,8 % para a deltametrina.

### 3.3.8. Avaliação do tempo de fortificação

O procedimento de fortificação da matriz “in vitro” pode não reproduzir na íntegra a amostra com os analitos quimicamente ligados aos constituintes da matriz. Deve-se levar em consideração durante as etapas de determinação das condições ótimas de metodologias de análises de resíduos de agrotóxicos, o tempo de “interação” dos agrotóxicos com a matriz durante o processo de fortificação (IMOTO, 2004; GARP, 1999).

Na literatura, os dados quanto ao intervalo de tempo necessário entre a fortificação de matrizes alimentícias e a extração, são divergentes. Segundo CARDOSO et al. (2004) a extração de agrotóxicos em laranjas por DMFS deve ser realizada após 3 horas de fortificação. O mesmo tempo de contato foi utilizado por IMOTO (2004) para análise de agrotóxicos em maçã. Por outro lado, DÓREA & LOPES (2004) e CABRAS et al. (1997), sugerem em seus experimentos um intervalo de 30 minutos entre a etapa de fortificação e o procedimento de extração dos agrotóxicos de quiabo e óleo de oliva, por DMFS e uma convencional extração com solventes, respectivamente.

Nesse trabalho, este parâmetro foi estudado com certa cautela, sendo avaliados os intervalos de 0, 3, 5, 7, 24, 168 e 432 horas, entre a aplicação da solução padrão dos quatro princípios ativos, clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, à polpa de batata e a extração, realizada conforme descrito no item 2.3.1.8 (pág. 26). Os resultados das análises estão apresentados na Figura 18.



**Figura 18.** Porcentagens de recuperação do clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, com intervalos de 0, 3, 5, 7, 24, 168 e 432 horas, entre a aplicação da solução padrão dos princípios ativos à polpa de batata e a extração.

Os resultados apresentados na Figura 18 mostram que maiores porcentagens de recuperação foram obtidas no intervalo de 0 a 7 horas de fortificação. Após este período, pode-se perceber que a estabilidade dos compostos, principalmente dos piretróides, na matriz é pequena, sendo observado após um dia de fortificação a degradação rápida da deltametrina, aproximadamente 75 %, seguida por aproximadamente 50 % de degradação da  $\lambda$ -cialotrina e da cipermetrina e 25 % do clorpirifós. Após uma semana de fortificação este comportamento torna-se mais lento não sendo observadas mudanças significativas entre os resultados obtidos após 168 e 432 horas de fortificação. Comportamento semelhante foi observado por VIEIRA (2005) durante um estudo realizado para avaliar a persistência dos piretróides deltametrina,  $\lambda$ -cialotrina, permetrina e cipermetrina em amostras de água.

Desta forma, visando altas taxas de recuperação e um intervalo de tempo que permitisse que maiores quantidades de amostras pudessem ser preparadas em um mesmo dia foi estipulado como tempo ideal de fortificação das amostras o período de 3 horas, já que não foram observadas diferenças

significativas entre os resultados obtidos após 3, 5 e 7 horas de contato, possivelmente devido ao alcance do equilíbrio entre os princípios ativos e a matriz.

Geralmente, a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos é realizada dias após a aplicação dos mesmos à cultura desta forma a técnica de extração utilizada deve ser capaz de extrair os compostos de interesse dos alimentos após grandes períodos de interação pesticida/matriz. Por isso, embora as condições de campo sejam bem diferentes das aplicadas no laboratório, maiores intervalos de tempo foram avaliados na tentativa de se simular uma situação mais próxima a realidade.

Ainda pode-se notar pelos dados da Figura 18 o quanto é importante respeitar o intervalo de carência estabelecido a cada pesticida para garantir que o alimento colhido não apresentará resíduo acima do LMR. Comparando-se os resultados obtidos (Figura 18) com os dados encontrados na literatura, observa-se que os períodos de carência determinados para os agrotóxicos em estudo estão de acordo com a toxicidade e taxa de degradação de cada produto. Para a deltametrina, um composto com alta taxa de degradação e baixa toxicidade (Classe III), a ANVISA estabelece um período de carência de 1 dia, enquanto para o clorpirifós (Classe II), mais tóxico e persistente é estabelecido o intervalo de 21 dias para a realização da colheita após a última aplicação. Aos piretróides,  $\lambda$ -cialotrina (classe III) e cipermetrina (Classe II) são estabelecidos períodos intermediários de 3 e 14 dias, respectivamente, respeitando suas taxas de degradação e toxicidade. É importante destacar que a validade destes intervalos de segurança estabelecidos por lei está relacionada com a aplicação das doses prescritas dos produtos.

### **3.3.9. Planejamento fatorial**

Os experimentos que visam investigar os efeitos de vários fatores sobre uma determinada resposta, normalmente são efetuados, através do 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, 1995).

Por isso, um planejamento fatorial completo,  $2^3$ , foi escolhido para avaliar simultaneamente a influência dos fatores: (1) proporção entre o volume de água, acetonitrila e acetato de etila, (2) força iônica e (3) tempo de extração.

O estudo univariado realizado previamente foi importante, para auxiliar na escolha das variáveis e na especificação dos níveis em que cada fator seria estudado.

Conforme descrito no item 2.3.1.9, a execução do planejamento fatorial consistiu em realizar os 8 ensaios em duplicata e registrar as porcentagens de extração obtidas para cada composto em todas as possíveis combinações dos níveis (+) e (-). Na Tabela 12, estão dispostas as porcentagens de recuperação média obtidas em cada ensaio para as amostras de batata fortificadas.

**Tabela 12.** Porcentagens de recuperação média e o desvio padrão associado às respostas, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de batata.

Ensaio	Fatores codificados			Recuperação (%) $\pm$ estimativa do desvio padrão			
	F1	F2	F3	Clorpirifós	$\lambda$ -Cialotrina	Cipermetrina	Deltametrina
1 e 1r	-	-	-	90,2 $\pm$ 0,5	86,2 $\pm$ 5,4	70,1 $\pm$ 4,2	85,4 $\pm$ 5,0
2 e 2r	+	-	-	87,6 $\pm$ 1,6	80,1 $\pm$ 3,4	67,7 $\pm$ 0,1	82,7 $\pm$ 1,0
3 e 3r	-	+	-	90,2 $\pm$ 0,2	80,5 $\pm$ 1,2	65,2 $\pm$ 0,7	75,6 $\pm$ 1,8
4 e 4r	+	+	-	87,6 $\pm$ 3,4	79,9 $\pm$ 1,8	67,1 $\pm$ 4,5	81,8 $\pm$ 7,6
5 e 5r	-	-	+	92,4 $\pm$ 0,8	88,3 $\pm$ 8,3	73,9 $\pm$ 7,1	94,3 $\pm$ 9,1
6 e 6r	+	-	+	93,7 $\pm$ 5,7	95,1 $\pm$ 1,6	82,8 $\pm$ 2,1	101,8 $\pm$ 2,3
7 e 7r	-	+	+	90,8 $\pm$ 2,2	85,3 $\pm$ 0,9	70,2 $\pm$ 0,8	87,3 $\pm$ 1,1
8 e 8r	+	+	+	98,8 $\pm$ 1,9	103,5 $\pm$ 1,3	84,0 $\pm$ 2,4	98,5 $\pm$ 4,5

F1 = Proporção (água:acetonitrila:acetato de etila), F2 = Força iônica (solução de NaCl), F3 = Tempo de sonicação.

Com o auxílio do programa Estatística 6.0<sup>®</sup> (StatSoft) e as porcentagens de recuperação obtidas nos ensaios, foi possível calcular a recuperação média, os efeitos de cada fator e as interações entre os fatores na extração de cada um dos inseticidas. A Tabela 13 reúne todos estes resultados. Como os

ensaios foram realizados em duplicata, pôde-se estimar o erro experimental associado à cada efeito, e a partir daí avaliar a significância estatística dos fatores sobre a porcentagem de recuperação de cada pesticida. Para decidir se os efeitos calculados eram significativos, o Statística 6.0<sup>®</sup> (StatSoft) realizou o teste de “student” para  $\alpha = 0,05$  e  $\nu = 8$ . No nível de 95 % de confiança o valor de t correspondente a 8 graus de liberdade é 2,306. Isso quer dizer que só foi considerado estatisticamente significativo, o efeito cujo valor de  $t_{\text{calculado}}$  foi maior que 2,306. A Tabela 13 mostra, simplificada, os resultados desta análise estatística.

**Tabela 13.** Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores ( $\pm$  estimativa do erro experimental) na extração de cada um dos inseticidas, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de batata.

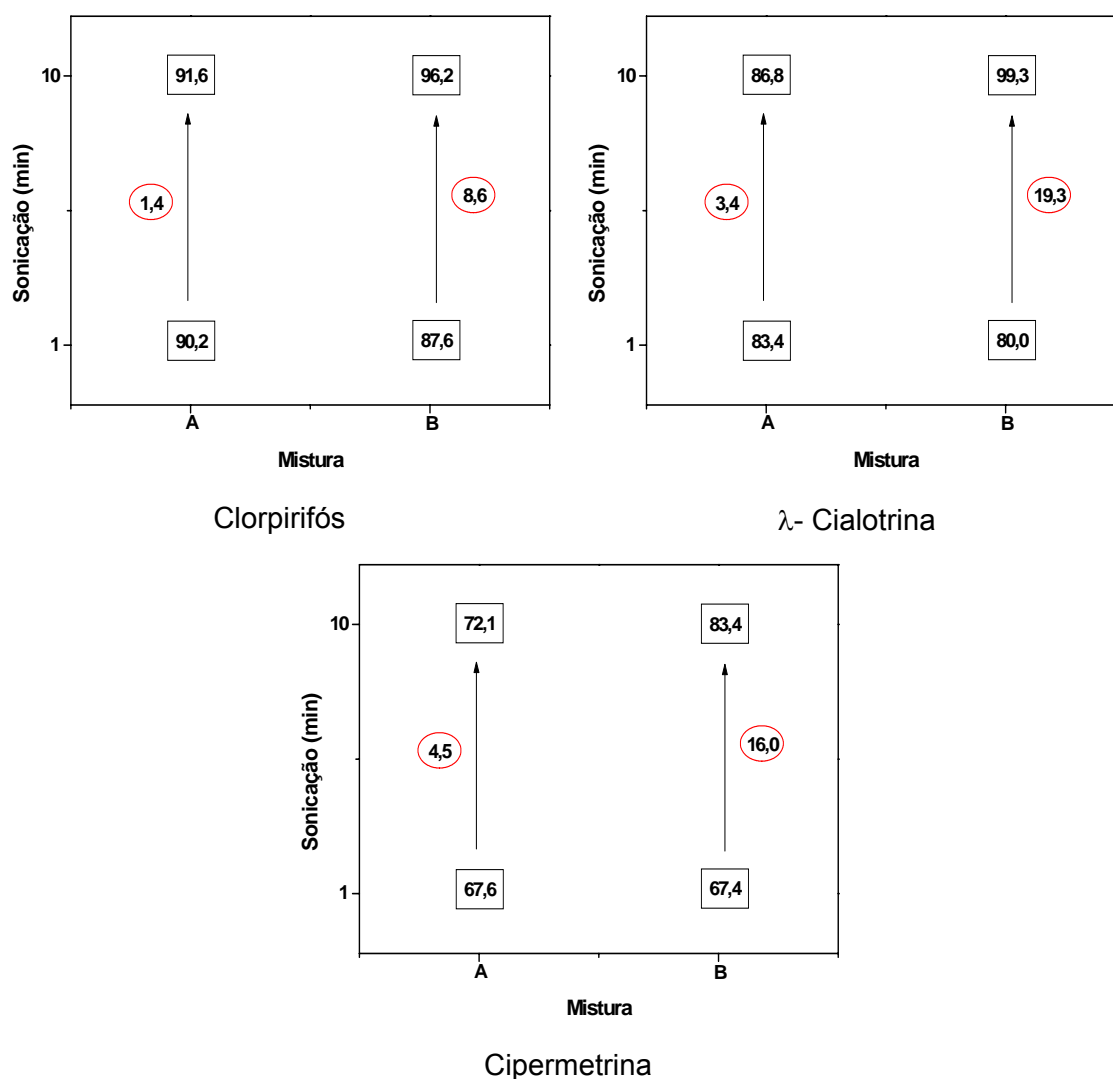
	Clorpirifós	$\lambda$ -Cialotrina	Cipermetrina	Deltametrina
Recuperação média	91,4 $\pm$ 0,9	87,4 $\pm$ 0,9	72,6 $\pm$ 0,8	88,4 $\pm$ 1,2
(1) Proporção	1,0 $\pm$ 1,4	<b>4,6 <math>\pm</math> 1,9*</b>	<b>5,5 <math>\pm</math> 1,7*</b>	<b>5,6 <math>\pm</math> 2,4*</b>
(2) Força iônica	0,9 $\pm$ 1,4	-0,1 $\pm$ 1,9	-2,0 $\pm$ 1,7	-5,2 $\pm$ 2,4
(3) Tempo (sonicação)	<b>5,0 <math>\pm</math> 1,4*</b>	<b>11,4 <math>\pm</math> 1,9*</b>	<b>10,2 <math>\pm</math> 1,7*</b>	<b>14,1 <math>\pm</math> 2,4*</b>
(1) e (2)	1,7 $\pm$ 1,4	4,2 $\pm$ 1,9	2,3 $\pm$ 1,7	3,1 $\pm$ 2,4
(1) e (3)	<b>3,6 <math>\pm</math> 1,4*</b>	<b>7,9 <math>\pm</math> 1,9*</b>	<b>5,8 <math>\pm</math> 1,7*</b>	3,8 $\pm$ 2,4
(2) e (3)	0,9 $\pm$ 1,4	2,8 $\pm$ 1,9	0,8 $\pm$ 1,7	0,1 $\pm$ 2,4

\*(Em negrito) Efeito estatisticamente significativo ao nível de 95 % de probabilidade pelo teste t ( $t_{\text{tab}} = t_{0,05; 8} = 2,306$ ).

Como não foi observado efeito de interação entre os fatores, para o piretróide deltametrina, os efeitos principais significativos, proporção e tempo de sonicação, podem ser interpretados separadamente. A troca da mistura extratora A pela B (pág. 27), aumentou o rendimento de extração de 5,6 % para deltametrina e o aumento do tempo de ultra-som proporcionou um aumento de 14,1 % na porcentagem de extração deste composto.

Para os demais agrotóxicos estudados, foi observada a existência do efeito de interação entre os fatores, proporção e tempo de ultra-som. Isto indica que os efeitos principais devem ser interpretados conjuntamente.

Para o organofosforado clorpirifós e os piretróides  $\lambda$ -cialotrina e cipermetrina, o aumento do tempo de ultra-som de 1 para 10 minutos, aumentou a porcentagem de recuperação dos agrotóxicos, mas este efeito foi mais pronunciado para um maior volume de acetato de etila, ou seja, com a mistura extratora B do que com a mistura A. Houve um aumento para o clorpirifós de 1,4 % contra 8,6 %,  $\lambda$ -cialotrina 3,5 % contra 19,3 % e cipermetrina 4,5 % contra 16,0 %. Estes efeitos de interação podem ser mais facilmente visualizados com os valores médios mostrados na Figura 19.



**Figura 19.** Diagramas para interpretação dos efeitos de interação observados no planejamento  $2^3$ .

Portanto, maiores rendimentos de extração, foram obtidos quando empregou-se a mistura B (pág. 27) com um maior tempo de sonicação, isto é, 96,2; 99,3 e 83,4 % em média, para o clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina e cipermetrina.

Já, o aumento da força iônica, não apresentou efeito, positivo ou negativo, significativo na porcentagem de recuperação dos quatro inseticidas em batata, como já havia sido observado nos testes univariados. Além disso, não foi observada a existência de interação entre esta variável e as demais.

Portanto, definiu-se como condições ótimas para análise do clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina por ESL-PBT em batatas, a extração com 1,0 mL de água, 6,5 mL de acetonitrila e 2,5 mL de acetato de etila, seguida de 10 minutos de sonicação.

### 3.4. Metodologia otimizada

As condições ótimas para análise simultânea dos agrotóxicos, clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em tubérculos empregando a técnica ESL-PBT e quantificação por cromatografia gasosa estabelecidas pelos experimentos realizados foram empregadas nas demais análises de amostras de batata.

Propõe-se como metodologia otimizada: extração de 3,000 g de batata triturada, previamente fortificada por 3 horas com  $1,6 \mu\text{g g}^{-1}$  de cada inseticida, com 1,0 mL de água, 6,5 mL de acetonitrila e 2,5 mL de acetato de etila, seguida de sonicação por 10 minutos.

Posteriormente, a mistura é deixada em caixas de isopor na gaveta do freezer a aproximadamente  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 12 horas. Decorrido o tempo estabelecido, o extrato é passado por um papel de filtro, previamente lavado com 5,0 mL de acetonitrila, contendo 1,5 g de sulfato de sódio anidro. O extrato é recuperado e aferido em balão volumétrico de 10,0 mL com acetonitrila, em seguida armazenado em frasco de vidro no freezer até o momento da análise cromatográfica.

A metodologia ESL-PBT otimizada proporcionou extratos limpos sem a necessidade de etapas adicionais de “clean up” e pequeno consumo de solvente, evitando-se ou reduzindo a necessidade de etapas de evaporação e

troca de solvente. Conseqüentemente, reduziram-se os riscos de contaminação e perdas de amostras, favorecendo a obtenção de altos níveis de recuperação.

## 3.5. Validação da metodologia analítica

### 3.5.1. Conceitos de validação

Segundo o dicionário Aurélio, validar é dar validade a; fazer (-se) ou tornar (-se) válido; legitimar (FERREIRA, 2000). A esses conceitos seguem-se:

- É a demonstração que um método de ensaio químico, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para obtenção de resultados com a qualidade exigida (INMETRO, 2003).
- É garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003).

Assim, dentre as várias definições e conceitos de validação de métodos pode-se concluir que este tipo de avaliação garante que o novo método analítico irá gerar informações confiáveis e interpretáveis da amostra, sendo então realizado de forma contínua, ao longo das etapas de planejamento da estratégia analítica, desenvolvimento e transferência (RIBANI et al., 2004).

Segundo o INMETRO (2003), os parâmetros de desempenho analítico normalmente utilizado para validação de métodos de separação e análise são: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

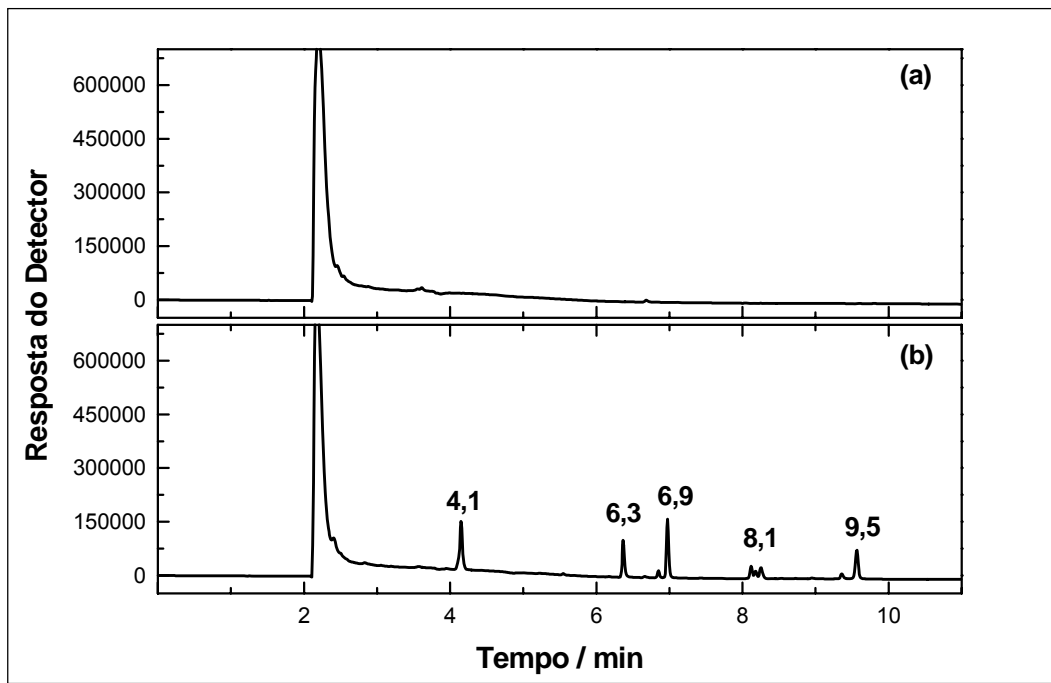
### 3.5.2. Seletividade

A seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003). Por isso, a seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação, para garantir que o pico de resposta analisado seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI et al., 2004).

Este parâmetro foi avaliado no método de análise dos inseticidas, clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em tubérculos, comparando-

se os cromatogramas de extratos da matriz isenta dos agrotóxicos com extratos da matriz fortificada com os compostos.

Na Figura 20, é mostrado a comparação dos cromatogramas.



**Figura 20.** (a) - Cromatograma de um extrato obtido de uma polpa de batata isenta dos princípios ativos e (b) - cromatograma de um extrato ( $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ) obtido de uma polpa de batata fortificada com os inseticidas estudados, em que:  $t_R = 6,3$  min: padrão interno,  $t_R = 4,1$  min: clorpirifós,  $t_R = 6,9$  min:  $\lambda$ -cialotrina,  $t_R = 8,1$  min: cipermetrina e  $t_R = 9,5$  min: deltametrina.

Não foi observado nenhum interferente com tempo de retenção próximo aos dos compostos de interesse. Dentre os fatores que contribuíram para a seletividade, pode-se destacar: os extratos límpidos obtidos do processo de extração e a utilização de um detector seletivo como o por captura de elétrons, que detecta apenas átomos que capturam elétrons (COLLINS et al., 1997).

### 3.5.3. Limite de detecção e limite de quantificação do CG-DCE

O limite de detecção (LD) do aparelho representa a menor concentração do analito em exame que pode ser diferenciada do ruído do sistema com segurança, mas não necessariamente quantificada. Enquanto que, o limite de

quantificação (LQ) corresponde à menor quantidade do analito que pode ser quantificada com exatidão (RIBANI et al., 2004).

Para se obterem os valores de LD e LQ, foi utilizado o método baseado nos parâmetros da curva analítica. Foram construídas curvas analíticas utilizando soluções padrão dos princípios ativos em concentrações decrescentes (12,0; 8,0; 6,0; 4,0 e 2,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e próximas ao suposto limite de detecção. A determinação do LD e do LQ do CG-DCE, foi realizada considerando-se como 3,3 e 10 vezes, respectivamente, a razão entre a estimativa dos coeficientes linear e angular da curva analítica de cada substância (item 2.5.3), (RIBANI et al., 2004). Os valores de LD e LQ, bem como os coeficientes linear e angular das curva analíticas, obtidos para cada um dos inseticidas são apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Coeficientes linear (s) e angular (S) das curvas analíticas, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), calculados para os quatro agrotóxicos estudados.

Agrotóxicos	s	S	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Clorpirifós	0,00357	0,00414	2,8	8,6
$\lambda$ -Cialotrina	0,00487	0,00401	4,0	12,1
Cipermetrina	0,00303	0,00225	4,4	13,5
Deltametrina	0,00146	0,00168	2,9	8,7

Os valores dos limites de detecção obtidos para os agrotóxicos, utilizando CG-DCE estão entre 2,8 e 4,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Enquanto os limites de quantificação, entre 8,6 e 13,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Sendo os menores valores de LD e LQ observados para o clorpirifós e a deltametrina. VIEIRA (2005) analisando  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em água e solo por CG-DCE obteve valores de LD de 1,1; 1,9 e 2,9  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Segundo RIBANI et al. (2004), LD e LQ podem ser influenciados tanto pelo tipo quanto pelo tempo de uso da coluna cromatográfica, além disso, a estabilidade do detector utilizado também pode influenciar a determinação cromatográfica destes parâmetros.

É importante destacar que os coeficientes de regressão das curvas analíticas da Tabela 14 diferem dos parâmetros obtidos nas curvas analíticas estabelecidas para os inseticidas no item 3.2.1. A divergência dos dados pode

ser explicada pelo fato que na determinação dos LD e LQ, os resultados foram obtidos com soluções padrão de concentrações baixas, próximas ao limite de detecção do cromatógrafo, portanto fora da faixa de concentração ideal. Enquanto que, na Tabela 6, os coeficientes foram determinados na faixa de linearidade de resposta do detector.

Levando-se em consideração os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pela ANVISA, para os agrotóxicos em batata, 1,0; 0,05; 0,05 e 0,01 mg kg<sup>-1</sup> para o clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, respectivamente, a quantidade da sub-amostra utilizada no método em desenvolvimento (3,000 g), o volume de extrato adquirido (10,0 mL) e as porcentagens de recuperação de cada composto, tem-se que as concentrações mínimas necessárias a serem detectadas pelo CG-DCE nos extratos são aproximadamente 270,0; 13,5; 12,0 e 3,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, respectivamente. Assim, pode-se observar que os valores de LD obtidos estão abaixo do exigido para cada agrotóxico no tipo de alimento avaliado, enquanto que os LQ estão próximos a esses valores, com exceção do clorpirifós, cujo LQ está bem abaixo do valor calculado.

Uma outra maneira de se determinar os limites de detecção e quantificação, é através do método visual. Neste procedimento as concentrações detectáveis e quantificáveis das substâncias de interesse são determinadas visualmente, considerando-se a quantidade de composto capaz de produzir um sinal analítico duas e dez vezes maior que o nível do ruído de fundo (COLLINS et al., 1997). Entretanto, esses limites são estabelecidos de forma a dar maior segurança aos resultados, sendo possível determinar durante este estudo de forma reprodutiva LD e LQ menor e igual a 2,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  embora estas quantidades dos compostos gerassem uma razão sinal/ruído, abaixo dos valores determinados teoricamente. Desta forma, o método mostra-se aplicável para análise dos resíduos em batata.

Na literatura são encontrados diversos trabalhos utilizando-se o método sem divisão de fluxo para injeção das amostras no cromatógrafo a gás ("splitless"), (DÓREA & LOPES, 2004; SHULING et al., 2006). Este tipo de procedimento permite que menores valores de LD e LQ sejam determinados, pois ocorre a introdução de maior quantidade de amostra na coluna cromatográfica.

### 3.5.4. Precisão

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra sob condições definidas (INMETRO, 2003). Em validação de métodos, a precisão pode ser considerada em níveis de repetitividade e precisão intermediária (RIBANI et al., 2004).

#### 3.5.4.1. Repetitividade

A repetitividade do método ESL-PBT dos quatro inseticidas estudados em tubérculos foi avaliada através do cálculo da estimativa do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação, de sete repetições do procedimento analítico otimizado (item 3.4).

Na Tabela 15, estão dispostos as porcentagens de recuperação (%R), os desvios padrão e os coeficientes de variação, CV(%), obtidos para cada composto.

**Tabela 15.** Porcentagens de recuperação (%R), estimativas do desvio padrão e coeficientes de variação, CV(%), dos inseticidas clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, de amostras de batata fortificadas, usando a ESL-PBT com sete repetições.

Clorpirifós		$\lambda$ -Cialotrina		Cipermetrina		Deltametrina	
%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)
93,8	2,4	94,4	2,4	82,1	2,6	97,9	2,8
( $\pm 2,3$ )		( $\pm 2,2$ )		( $\pm 2,1$ )		( $\pm 2,8$ )	

$\pm$  = estimativa do desvio padrão.

Observa-se, pelos resultados contidos na Tabela 15, que os coeficientes de variação obtidos para as amostras de batata variaram entre 2,4 e 2,8 %. Segundo RIBANI et al. (2004), em métodos de análise de traços, são aceitos CV até 20 %, dependendo da complexidade da amostra. Como amostras de alimentos são consideradas amostras complexas, os pequenos valores de CV, demonstraram que o método estudado apresentou uma boa precisão, em termos de repetitividade.

### 3.5.4.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do mesmo laboratório, devido a eventos como diferentes dias ou diferentes equipamentos ou diferentes analistas ou uma combinação destes fatores (RIBANI et al., 2004).

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,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em batata, por ESL-PBT, após 1 semana, 1 mês e 2 meses, da realização do primeiro teste, todos feitos pelo mesmo analista nas mesmas condições.

As porcentagens de recuperação e os coeficientes de variação obtidos para cada composto foram utilizados para a análise da precisão intermediária, e estão apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16.** Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação, CV(%), dos inseticidas clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, de amostras de batata fortificadas, usando a ESL-PBT em diferentes dias.

	Clorpirifós		$\lambda$ -Cialotrina		Cipermetrina		Deltametrina	
	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)
1 dia	91,9 ( $\pm 1,1$ )	1,2	93,0 ( $\pm 1,8$ )	1,9	82,5 ( $\pm 2,7$ )	3,3	97,4 ( $\pm 1,6$ )	1,7
1 semana	92,9 ( $\pm 5,2$ )	5,5	90,4 ( $\pm 3,8$ )	4,2	81,6 ( $\pm 3,9$ )	4,8	101,1 ( $\pm 2,0$ )	2,0
1 mês	93,2 ( $\pm 5,1$ )	5,5	90,1 ( $\pm 3,2$ )	3,6	81,6 ( $\pm 1,1$ )	1,4	100,9 ( $\pm 1,5$ )	1,5
2 meses	90,5 ( $\pm 1,9$ )	2,0	94,3 ( $\pm 1,6$ )	1,7	81,9 ( $\pm 2,0$ )	2,4	98,9 ( $\pm 2,9$ )	2,9

$\pm$  = estimativa do desvio padrão.

Nota-se, pelos dados dispostos na Tabela 16, que os CV obtidos para todos os compostos variaram de 1,2 a 5,5 %, mostrando que a precisão intermediária é excelente, uma vez que são admitidos valores de CV até 20 % para amostras complexas (RIBANI et al, 2004). Desta forma, verificou-se que a técnica ESL-PBT otimizada para análise de resíduos de clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina,

cipermetrina e deltametrina em tubérculos, apresentou resultados sem diferenças significativas no mesmo laboratório em épocas diferentes.

### **3.5.5. Exatidão**

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2003). Dentre os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método estão os ensaios de recuperação e a comparação de métodos, os quais foram utilizados neste trabalho.

#### **3.5.5.1. Ensaio de recuperação**

É importante considerar como a eficiência do método varia em função da concentração das substâncias de interesse. Por isso, ensaios de recuperação foram realizados adicionando-se os agrotóxicos às amostras de batata trituradas em concentrações próximas, 1, 2 e 10 vezes o valor encontrado como limite de quantificação (LQ) (item 3.5.3). Este tipo de procedimento é recomendado pelo GARP (1999), para análises que são realizadas em nível de traços.

Desta forma, os princípios ativos, clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, foram extraídos de polpas de batata, conforme o procedimento descrito no item 2.5, obtendo-se em 10,0 mL de extrato orgânico final, as concentrações de 15,0; 30,0 e 150,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para cada um dos inseticidas estudados.

As porcentagens de recuperação e os coeficientes de variação obtidos nos ensaios, para cada pesticida, estão dispostos na Tabela 17.

**Tabela 17.** Porcentagens de recuperação (%R), estimativa do desvio padrão e coeficiente de variação, CV(%), obtidos no ensaio de recuperação.

Concentração Extrato ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Clorpirifós		$\lambda$ -Cialotrina		Cipermetrina		Deltametrina	
	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)
15,0	91,9 ( $\pm 3,5$ )	3,8	93,1 ( $\pm 3,1$ )	3,4	82,4 ( $\pm 1,7$ )	2,1	100,1 ( $\pm 2,8$ )	2,8
30,0	92,3 ( $\pm 2,5$ )	2,7	90,4 ( $\pm 2,7$ )	2,9	80,3 ( $\pm 3,8$ )	4,7	100,8 ( $\pm 5,0$ )	4,9
150,0	93,6 ( $\pm 1,2$ )	1,2	90,2 ( $\pm 1,5$ )	1,6	80,7 ( $\pm 2,7$ )	3,4	103,3 ( $\pm 3,4$ )	3,3

$\pm$  = estimativa do desvio padrão.

De acordo com os resultados da Tabela 17, pode-se observar a exatidão do método proposto, já que as porcentagens de recuperação obtidas nos três níveis ensaiados (1, 2 e 10 x LQ) não diferem entre si ao nível de 95 % de probabilidade pelo teste t e os coeficientes de variação, CV(%), apresentam-se menores que 5 %, independente da concentração.

Além disso, os resultados apresentados na Tabela 17, são equivalentes aos obtidos no item 3.5.4.2, Tabela 16, em que foi avaliada a precisão intermediária, comprovando também a exatidão e a precisão do método.

Considerando-se os LMR dos inseticidas de interesse em batatas (1,0; 0,05; 0,05 e 0,01  $\text{mg kg}^{-1}$ , para o clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, respectivamente) e as porcentagens de recuperação obtidas ao nível de fortificação de 0,05  $\text{mg kg}^{-1}$ , ou seja, 15,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  no extrato, nota-se que todos os agrotóxicos foram bem extraídos da matriz, nesta concentração próxima aos seus LMR. Desta maneira, pode-se estabelecer que o limite de quantificação do método proposto (0,05  $\text{mg kg}^{-1}$ ) atinge os LMR estabelecidos para os compostos de interesse, com exceção da deltametrina. Para o clorpirifós, o limite de quantificação do método, mostrou-se bastante inferior ao seu LMR.

Embora se tenha percebido um comprometimento na análise da deltametrina, menores níveis de fortificação não foram avaliados devido a baixa sensibilidade do cromatógrafo à pequenas concentrações na época da realização destas análises. Sugere-se como alternativa para melhorar o LQ do

método nestes casos, a realização de uma etapa de pré-concentração dos extratos antes da análise cromatográfica, ou a injeção da amostra no modo sem divisão de fluxo (splitless). Desta forma, o método pode permanecer como otimizado e validado e estar adequado à finalidade proposta.

### 3.5.5.2. Comparação de métodos

Neste trabalho os resultados obtidos empregando-se a metodologia ESL-PBT em amostras de batata fortificadas (item 3.5.4.1), foram comparados aos resultados obtidos pelo método multirresíduo utilizado pelo IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária), para extração dos agrotóxicos clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em alimentos, conforme descrito no item 2.5.5.2. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 18.

**Tabela 18.** Porcentagens de recuperação (%R), estimativa do desvio padrão e coeficiente de variação, CV(%), dos inseticidas clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, de amostras de batata fortificadas, empregando o método ESL-PBT e o método utilizado pelo IMA.

	Clorpirifós		$\lambda$ -Cialotrina		Cipermetrina		Deltametrina	
	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)
ESL-PBT	93,8 ( $\pm 2,3$ )	2,4	94,4 ( $\pm 2,2$ )	2,4	82,1 <sup>a</sup> ( $\pm 2,1$ )	2,6	97,9 ( $\pm 2,8$ )	2,8
Método	98,5 ( $\pm 4,3$ )	4,4	87,0 ( $\pm 4,6$ )	5,3	81,9 <sup>a</sup> ( $\pm 3,7$ )	4,5	80,0 ( $\pm 2,6$ )	3,2
IMA								

$\pm$  = estimativa do desvio padrão, letras semelhantes (a) = resultados estatisticamente semelhantes ao nível de 95 % de probabilidade pelo teste t.

Analisando-se o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos (Tabela 18), observa-se que a  $\lambda$ -cialotrina e principalmente a deltametrina, foram melhores extraídas pela técnica ESL-PBT, enquanto que as porcentagens de recuperação obtidas para a cipermetrina foram estatisticamente iguais. No entanto, os dois métodos não apresentaram grande dispersão entre os resultados.

O método multirresíduo empregado pelos laboratórios do Instituto Mineiro de Agropecuária consiste basicamente em uma extração sólido-líquido,

utilizando como solventes extratores acetona, diclorometano e hexano. Apresenta um grande consumo de solvente orgânico (100,0 mL) e várias etapas de preparação da amostra, características que acarretam aumento do custo das análises e diminuição da produtividade dos laboratórios. O uso de diclorometano, solvente incompatível com o detector por captura de elétrons, torna necessário a etapa de evaporação para ser trocado. O diclorometano ainda apresenta alta toxicidade, inflamabilidade e riscos ambientais. A acetonitrila, empregada na ESL-PBT, também é tóxica, mas segundo MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY (2004), os impactos negativos causados a saúde humana e ao meio ambiente por este solvente são menores do que os causados por solventes clorados como o diclorometano. De acordo com a US Environmental Protection Agency (EPA), a acetonitrila não é classificada como carcinogênica para os seres humanos e é pouco persistente no meio ambiente. Além disso, sua baixa volatilidade reduz a exposição dos analistas a vapores durante a preparação da amostra.

Como vantagens, o método IMA apresenta um fator de concentração do extrato igual a 10, que pode contribuir para uma melhor detectabilidade do método e o fato de poder ser aplicado em diferentes matrizes (cenoura, morango, batata, etc) para a análise de uma ampla faixa de agrotóxicos de distintas famílias.

Por outro lado, a ESL-PBT apresenta um menor consumo de solvente (10,0 mL), e ainda não necessita de uma etapa de evaporação e troca de solvente, reduzindo os riscos de contaminação e perdas dos analitos de interesse, proporcionando resultados mais precisos, que podem ser observados (Tabela 18) através dos coeficientes de variação ligeiramente menores quando a metodologia ESL-PBT é empregada.

### **3.5.5. Robustez**

A capacidade do método em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos, ou seja, sua robustez pode ser avaliada através de resultados de análises realizadas sob pequenas mudanças nas condições analíticas, tais como: tempo de agitação, tamanho da amostras, tempo de aquecimento e pH. Parâmetros como temperatura da coluna cromatográfica e

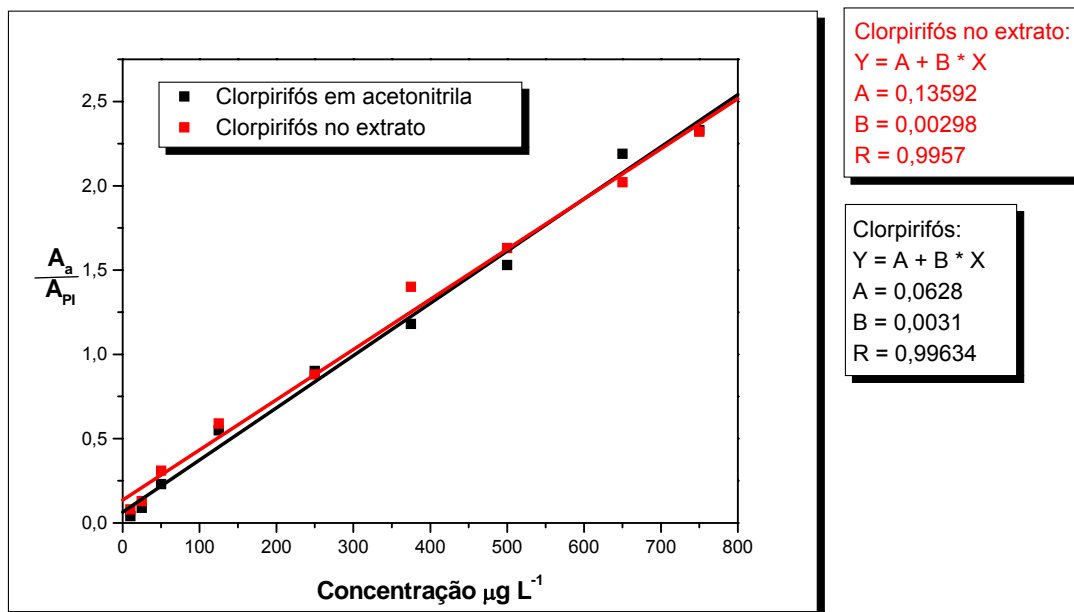
velocidade do gás de arraste, também podem resultar em variação na resposta do método (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003).

Embora não tenha sido realizado neste trabalho nenhum teste específico para avaliação deste parâmetro, durante o desenvolvimento da metodologia proposta para análise dos princípios ativos, clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em batata, ocorreram pequenas alterações no ambiente de análise, tais como: mudança das marcas e dos lotes dos solventes utilizados, pequenas variações nas proporções dos solventes da mistura extratora e no tempo de sonicação, uso de colunas cromatográficas de diferentes fabricantes com alterações nas programações de temperatura e a realização das análises no cromatógrafo a gás em diferentes épocas, sem alterações significativas nos resultados, por isso pode-se dizer que o método ESL-PBT otimizado, possui uma robustez intrínseca, pois manteve sua resposta em meio a pequenas variações.

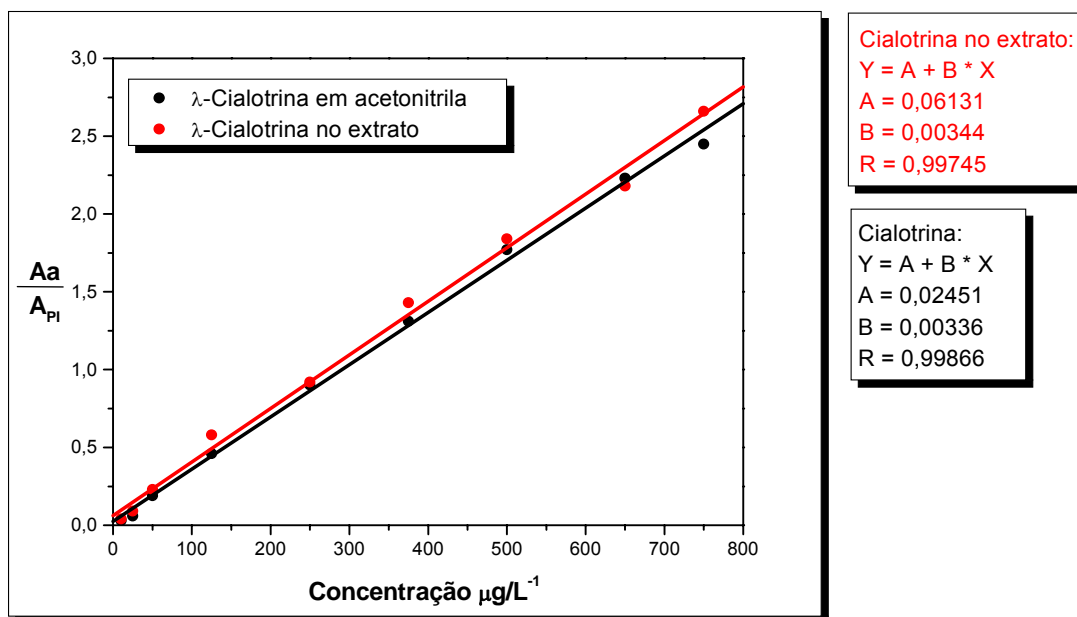
### **3.6. Efeito da matriz no método multirresíduo**

A avaliação do efeito da matriz no método ESL-PBT, foi realizada de acordo com o procedimento descrito no item 2.6.

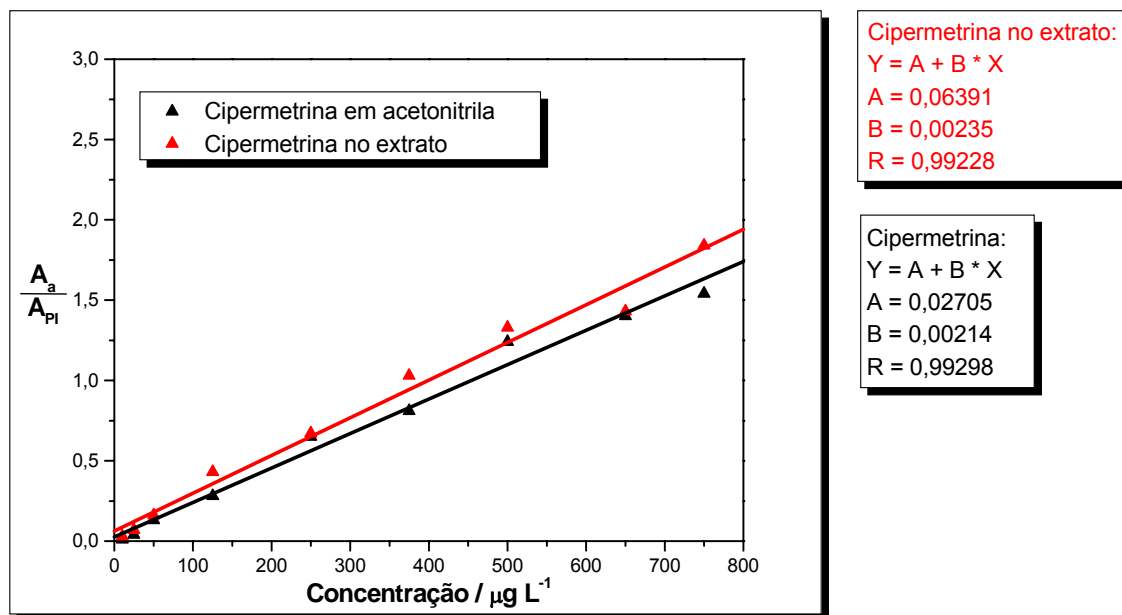
Na Figura 21 estão os dois tipos de curvas analíticas obtidas com os agrotóxicos em acetonitrila e no extrato orgânico da matriz com a adição dos analitos. As retas das curvas analíticas construídas em acetonitrila foram desenhadas em preto e as do extrato orgânico em vermelho, para uma melhor visualização.



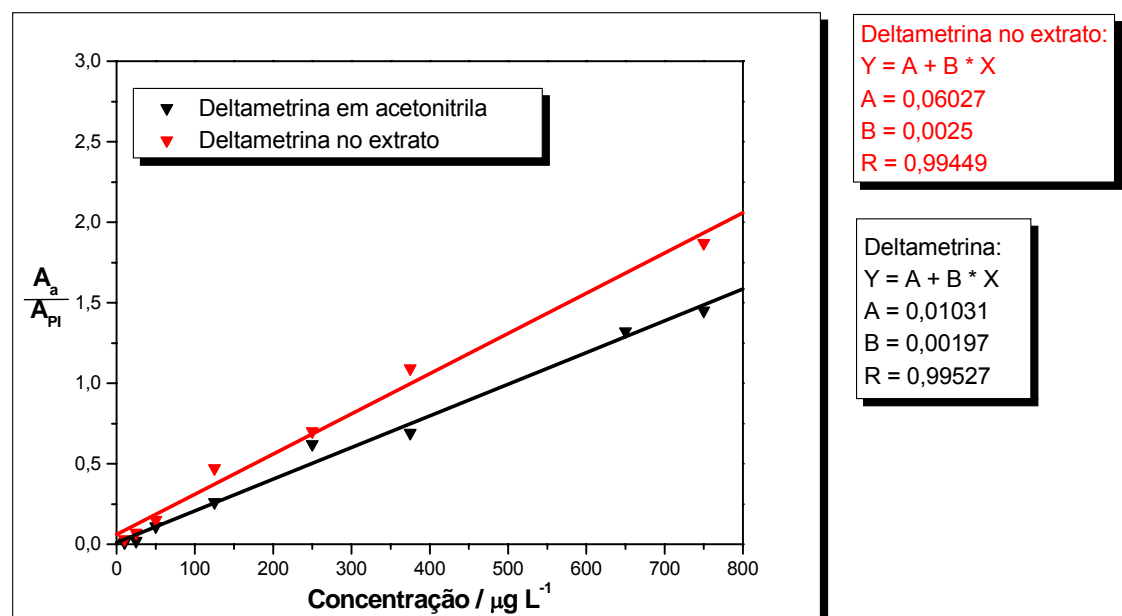
(a) Clorpirifós



(b) λ-Cialotrina



(c) Cipermetrina



(d) Deltametrina

**Figura 21.** Curvas analíticas dos princípios ativos (a) clorpirifós, (b)  $\lambda$ -cialotrina, (c) cipermetrina e (d) deltametrina em acetoneitrila e em extratos do branco.

Pode-se observar que o efeito da matriz na resposta cromatográfica foi mais significativo para a cipermetrina e a deltametrina, devido à maior diferença

dos valores dos coeficientes angular (na inclinação) das curvas construídas em solvente puro e com o extrato orgânico da batata. Nas demais curvas esta diferença não foi tão significativa. Este comportamento está de acordo com os dados encontrados por SÁNCHEZ-BRUNETE et al. (2005) que durante um estudo realizado para controlar o efeito de matriz na determinação de agrotóxicos em solo, mel e suco de maçã, observaram que compostos menos polares e com altas massas molares como os piretróides tiveram suas respostas cromatográficas aumentadas quando extratos dos brancos das matrizes foram fortificados com padrões e analisados.

Desta forma, nota-se que os resultados obtidos pelo método ESL-PBT em batatas sofrem efeito da matriz. A alteração provocada pode ser demonstrada pela diferença de inclinação das curvas obtidas quando construídas em solvente orgânico (acetonitrila) com a curva construída no extrato orgânico da matriz. A Tabela 19 mostra os percentuais das diferenças dos coeficientes angular (inclinação das curvas) entre os dois tipos de curvas estudadas.

**Tabela 19.** Variações (%) das inclinações das curvas analíticas dos agrotóxicos estudados em solvente (acetonitrila) e na matriz.

Agrotóxicos	(S) solvente	(S) matriz	Variação (%)
Clorpirifós	0,00310	0,00298	4
$\lambda$ -Cialotrina	0,00336	0,00344	2
Cipermetrina	0,00214	0,00235	10
Deltametrina	0,00197	0,00250	27

(S) = coeficientes angular.

Estas variações (%) ficaram ainda mais evidentes quando a curva analítica construída no extrato orgânico foi utilizada para a quantificação dos agrotóxicos clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em extratos obtidos de amostras de batata fortificadas. Na Tabela 20, são mostradas as porcentagens de recuperação obtidas quando utilizada a curva analítica preparada em acetonitrila e quando eliminado o efeito da matriz com a curva preparada em extratos obtidos de amostras de batata isentas de agrotóxicos.

**Tabela 20.** Porcentagens de recuperação (%R) dos quatro inseticidas estudados utilizando-se o método do padrão interno, para curvas analíticas preparadas em acetonitrila e no extrato orgânico.

	Clorpirifós		$\lambda$ -Cialotrina		Cipermetrina		Deltametrina	
	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)
Curva em acetonitrila	93,5 ( $\pm 1,9$ )	2,0	91,7 ( $\pm 1,9$ )	2,0	81,3 ( $\pm 4,7$ )	5,8	103,6 ( $\pm 1,8$ )	1,8
Curva no extrato	88,5 ( $\pm 0,9$ )	1,0	88,3 ( $\pm 2,7$ )	3,0	71,2 ( $\pm 2,3$ )	3,2	84,6 ( $\pm 1,8$ )	2,2

$\pm$  = estimativa do desvio padrão.

Observa-se na Tabela 20, que a quantificação dos analitos realizada com a curva analítica em acetonitrila apresenta taxas de recuperação maiores com relação aos valores determinados pela curva no extrato orgânico. Obviamente, os resultados refletem a variação mostrada na Tabela 19.

Estes “erros” quantitativos devido ao efeito da matriz são comumente encontrados em análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos usando a cromatografia gasosa (BERNAL et al., 1997; JIMÉNEZ et al., 1998). Segundo SÁNCHEZ-BRUNETE et al. (2005), IMOTO (2004), BERNAL et al., (1997), a explicação para a ocorrência ou não deste fenômeno é o fato de que alguns componentes da matriz competem com os agrotóxicos pelos sítios ativos do sistema cromatográfico, principalmente do tubo de inserção da amostra (tubo de vidro localizado no injetor chamado “liner” ou “insert”), diminuindo a interação dos mesmos com os agrotóxicos, e então permitindo que uma maior quantidade de pesticida seja transferida para a coluna cromatográfica que, conseqüentemente, chegando em sua totalidade no detector irá gerar um aumento da resposta cromatográfica.

### 3.6.1. Avaliação do efeito da matriz na análise cromatográfica em diferentes tipos de batata

O efeito da matriz na porcentagem de recuperação dos inseticidas clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina na metodologia ESL-PBT foi

avaliado em dois tipos de cultivares de batata, Monalisa e Asterix conforme o procedimento descrito no item 2.6.1.

As porcentagens de recuperação (%R) determinadas com curvas analíticas construídas com extrato orgânico de batatas Monalisa e os coeficientes de variação, CV(%), obtidos após as extrações dos inseticidas nas duas variedades de batata, estão apresentados na Tabela 21.

**Tabela 21.** Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação, CV (%), obtidos após extrações dos quatro inseticidas estudados em duas variedades de batata, pelo método ESL-PBT.

	Clorpirifós		$\lambda$ -Cialotrina		Cipermetrina		Deltametrina	
	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)
Monalisa	88,5 ( $\pm 0,9$ )	1,0	88,3 ( $\pm 2,7$ )	3,0	71,2 ( $\pm 2,3$ )	3,2	84,6 ( $\pm 1,8$ )	2,2
Asterix	87,5 ( $\pm 2,5$ )	2,9	86,6 ( $\pm 2,1$ )	2,4	71,2 ( $\pm 3,1$ )	4,3	80,8 ( $\pm 3,5$ )	4,3

$\pm$  = estimativa do desvio padrão.

Pela análise dos dados da Tabela 21, nota-se que o efeito da matriz na resposta cromatográfica foi semelhante para os dois tipos de cultivares analisados.

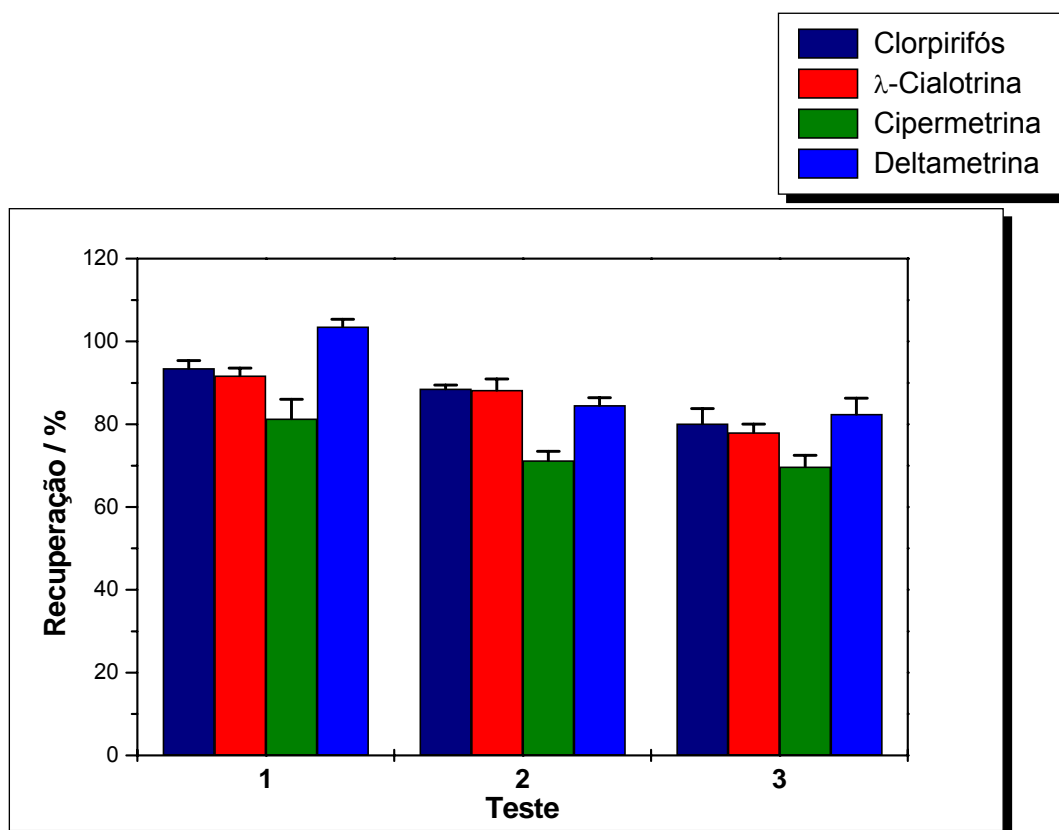
Também foi possível notar, que os tubérculos da variedade Asterix proporcionaram extratos transparentes, mas levemente amarelados por apresentarem polpa amarela e casca rosada, enquanto que a variedade Monalisa proporcionou extratos praticamente incolores por possuir casca e polpa amarela clara. Porém, os dados da Tabela 21, mostram que a coloração dos extratos não influenciou no efeito da matriz nas porcentagens de recuperação dos agrotóxicos de interesse.

### 3.6.2. Avaliação do efeito da matriz na análise cromatográfica em função do tempo e da forma de armazenamento de batatas e de extratos

A avaliação do efeito da matriz nas respostas cromatográficas dos agrotóxicos clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina após diferentes

tempos e formas de armazenamento da matriz foi realizada utilizando-se o procedimento descrito no item 2.6.2.

Os extratos obtidos após fortificação e extração das amostras de batata armazenadas inteiras e trituradas por dois meses, foram analisados juntamente com os extratos antigos guardados em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por meses. As porcentagens de recuperação dos compostos de interesse foram determinadas com o uso de curvas analíticas construídas com soluções padrões em acetonitrila. Na Figura 22 são mostrados os resultados obtidos da análise dos extratos de batatas guardadas em comparação com os dados apresentados no item 3.6, Tabela 20, em que uma das etapas de quantificação foi realizada com curvas analíticas construídas no extrato orgânico, eliminando-se o efeito da matriz nos resultados.



**Figura 22.** Porcentagens de recuperação do clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, obtidas com curvas analíticas 1 = em acetonitrila 2 = em extratos orgânicos fortificados. Análise realizada em: 3 = batata guardada por dois meses, utilizando para quantificação curvas analíticas construídas com soluções padrão em solvente puro.

---

Pela análise dos dados apresentados na Figura 22, observa-se que batatas inteiras guardadas por dois meses a aproximadamente  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  após trituradas, fortificadas e extraídas, apresentaram resultados semelhantes aos obtidos quando eliminado o efeito da matriz nas porcentagens de recuperação dos compostos (Teste 2). Comportamento semelhante foi observado na análise das amostras armazenadas trituradas e dos extratos armazenados. Possivelmente, mesmo a baixa temperatura ocorra mudanças químicas dos compostos da matriz avaliada.

### 3.7. Aplicação da metodologia ESL-PBT em amostras de batata da região Sul do estado de Minas Gerais e do comércio de Viçosa-MG

A técnica ESL-PBT otimizada (item 3.4) foi aplicada em amostras de batata coletadas em lavouras da região Sul do estado de Minas Gerais e no comércio local da cidade de Viçosa-MG, conforme o procedimento descrito no item 2.7. A Tabela 22 mostra os resultados dessas análises.

**Tabela 22.** Resíduos de clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina encontrados em diferentes amostras de batatas.

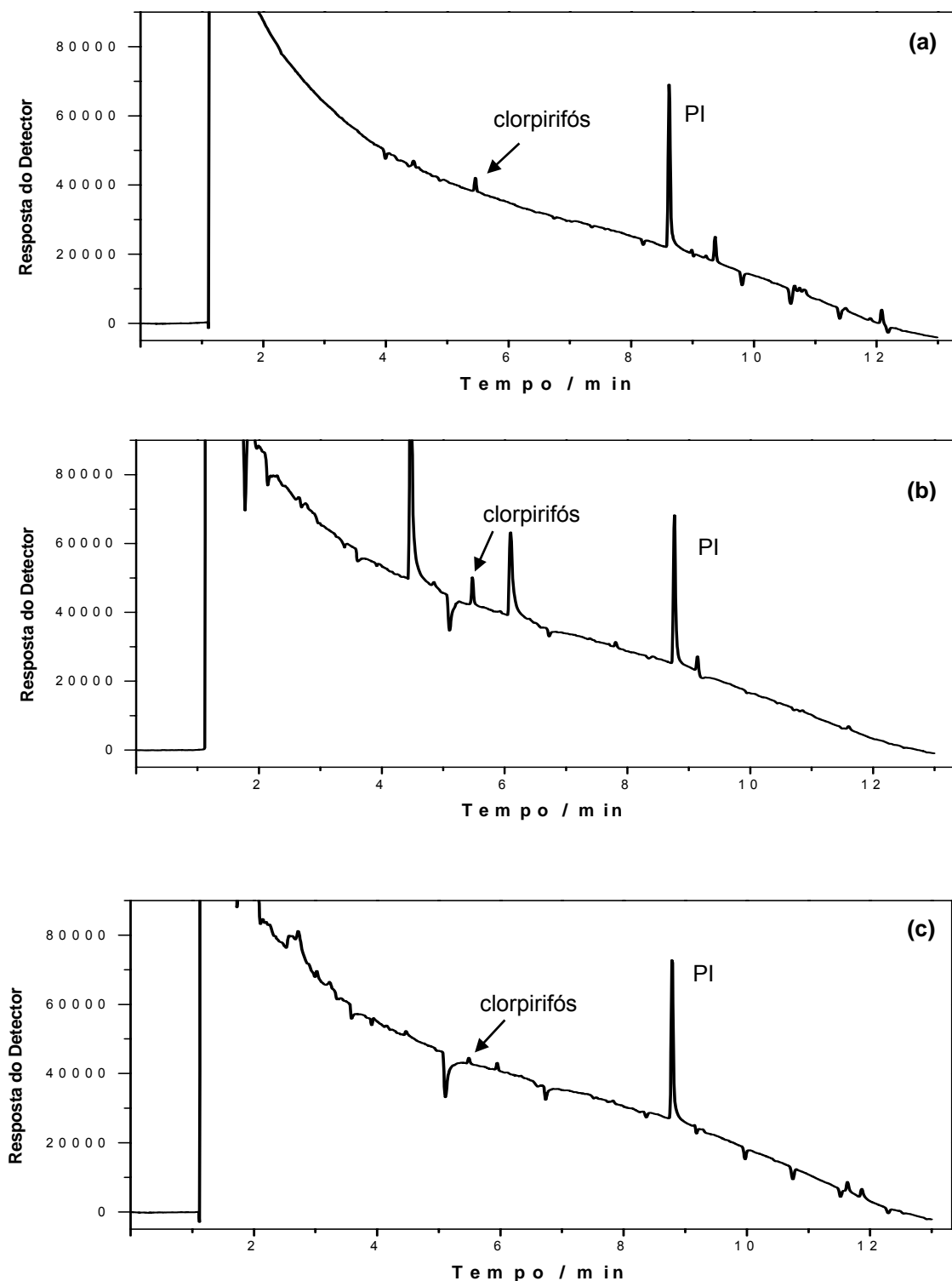
Amostras		Clorpirifós	$\lambda$ -Cialotrina	Cipermetrina	Deltametrina
		mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>
Sul de MG	1 (Ágata)	ND	ND	ND	ND
	2 (Asterix)	ND	ND	ND	ND
	3 (Asterix)	ND	ND	ND	ND
	4 (Cupido)	0,23	ND	ND	ND
	5 (Ágata)	ND	ND	ND	ND
	6 (Ágata)	D*	ND	ND	ND
	7 (Monalisa)	0,05	ND	ND	ND
Comércio local	8a (Monalisa) graúda	ND	ND	ND	ND
	8b miúda	D*	ND	ND	ND

( ) = variedade da batata analisada, ND = não detectado (abaixo do limite de detecção do aparelho) D\* = presença de clorpirifós abaixo do LQ do método.

Conforme pode ser observado não foram detectados resíduos de  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, em qualquer uma das amostras analisadas. Nas amostras 4, 6, 7 e 8b foram encontrados resíduos de clorpirifós, todos em níveis inferiores ao LMR estabelecido para esta cultura (1,0 mg kg<sup>-1</sup>).

A Figura 23, ilustra os cromatogramas correspondentes à solução padrão de clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina 30,0  $\mu$ g L<sup>-1</sup> e às

amostras de batata 4 e 7 que apresentaram a presença de resíduos de agrotóxico.



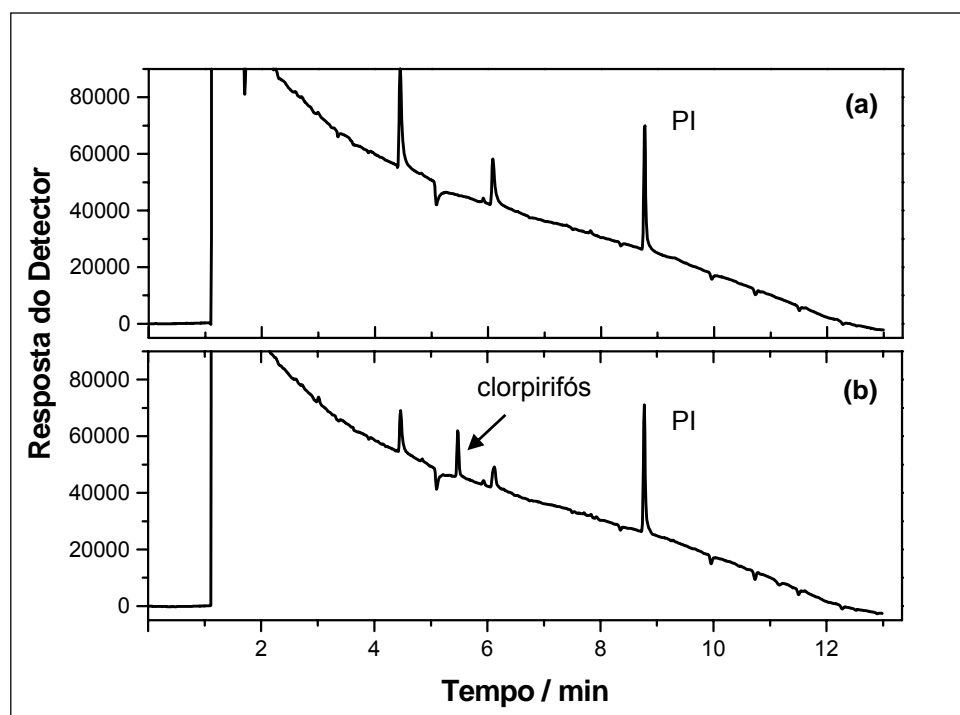
**Figura 23.** Cromatogramas correspondentes: (a) solução padrão de  $30,0 \mu\text{g L}^{-1}$  dos princípios ativos estudados, (b) e (c) a presença de clorpirifós nas amostras 4 e 7, respectivamente. (PI = padrão interno).

Cabe ressaltar, que as amostras em que não foram detectados resíduos de clorpirifós, com exceção da amostra 5, foram cultivadas pelo sistema de produção denominado Sistema de Produção Integrada de Batata (PIB), que tem como principal objetivo a produção de alimentos com alta qualidade, para cuja obtenção dá-se prioridade aos métodos ecologicamente corretos e a minimização da aplicação de agrotóxicos.

### 3.7.1. Aplicação da metodologia ESL-PBT em partes isoladas da batata

Com a finalidade de se avaliar a região dos tubérculos em que a maior parte do agrotóxico clorpirifós fica retida, a técnica ESL-PBT foi empregada em batatas em que foram identificados resíduos deste pesticida (amostra 4-item 3.7), analisando-se individualmente a polpa e a casca.

Os cromatogramas das análises dos extratos obtidos da polpa e da casca são apresentados na Figura 24.



**Figura 24.** Cromatogramas obtidos de extratos da polpa (a) e da casca (b) de uma amostra de batata contaminada por resíduos de clorpirifós, usando a metodologia ESL-PBT (PI = padrão interno).

Pela Figura 24, pode-se observar que foi identificado a presença do organofosforado clorpirifós (cerca de  $0,97 \text{ mg kg}^{-1}$ ) apenas na casca das batatas analisadas. Comparando-se este resultado com o obtido no item 3.7 quando analisado polpa + casca homogeneizadas (amostra 4), observa-se que foi detectada uma concentração de aproximadamente quatro vezes maior de resíduos de clorpirifós quando analisado isoladamente a casca .

Além disso, considerando-se que o clorpirifós é um composto não-sistêmico, como os piretróides, portanto, não são absorvidos pelas raízes e/ou folhas e translocados para todas as partes da plantas, tendem a permanecer próximo ao local em que foram aplicados formando-se um depósito na superfície da cultura (COLUMÉ et al., 2001; BARBOSA, 2004) é cabível supor que resíduos de agrotóxicos piretróides também tenderão a ficarem retidos na casca.

### **3.7.2. Comportamento dos resíduos de clorpirifós em batata após cozimento**

Foi avaliado neste trabalho, a possibilidade de se remover e/ou reter os resíduos de clorpirifós dos tubérculos (amostras 6 e 7-item 3.7) após o processo de cozimento. Para tal, foram separadas e analisadas individualmente das amostras de batata cozidas, a polpa, a casca e água do cozimento, segundo o item 2.7.2.

Das partes estudadas, foi constatada após o cozimento aproximadamente  $0,35$  e  $0,86 \text{ mg kg}^{-1}$  de resíduos de clorpirifós, para as amostras 6 e 7, respectivamente, apenas nas cascas cozidas.

A comparação da concentração do resíduo de clorpirifós encontrado no item 3.7, em que foram analisados extratos obtidos da casca + polpa triturados crus, para a amostra 7, com a obtida da avaliação da casca cozida para a mesma amostra de batata apresentou um aumento de cerca de 17 vezes.

Desta forma, pôde-se observar que a temperatura elevada da água durante a etapa de cozimento, não favoreceu a remoção dos resíduos de clorpirifós presentes na batata. Nesse mesmo sentido, PENA et al. (2003b) analisando clorpirifós em alface, observaram que a simples limpeza com água corrente, não foi capaz de eliminar resíduos deste organofosforado dessas hortaliças.

## 4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi otimizada e validada a metodologia ESL-PBT, para análise simultânea dos inseticidas clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em batata.

Na etapa de otimização foram avaliados: mistura extratora, força iônica da solução aquosa, efeito do ultra-som, tipo de congelamento, mistura extratora contendo metanol, tempo de extração e tempo de fortificação para determinação das condições ideais de análise dos compostos de interesse.

A metodologia ESL-PBT mostrou-se eficiente para análise dos resíduos de agrotóxicos estudados, com porcentagens de recuperação acima de 80 %. Além disso, apresentou baixo consumo de solvente e extratos transparentes, não necessitando de etapas de purificação para análise cromatográfica.

Os parâmetros avaliados no processo de validação, tais como: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão indicaram que a metodologia é eficiente para a extração dos resíduos de clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina de batata com limites de detecção abaixo dos LMR estabelecidos para estes agrotóxicos neste tipo de alimento.

Foi observada a presença de efeito da matriz na análise cromatográfica dos compostos de interesse, obtendo-se porcentagens de recuperação acima de 70 % quando a curva analítica preparada em extratos orgânicos fortificados foi utilizada para quantificação dos compostos. O efeito da matriz apresentou-se semelhante em dois diferentes tipos de batata analisadas, e mostrou-se ausente em batatas e extratos armazenados a -20 °C durante 2 meses.

A técnica otimizada e validada foi aplicada em amostras de batata adquiridas na região Sul do estado de Minas Gerais e no comércio de Viçosa-MG, sendo encontrado resíduos de clorpirifós abaixo do seu LMR para batata.

Uma vez contaminadas, a retenção dos resíduos deste organofosforado ocorre na casca dos tubérculos e não é eliminado após o processo de cozimento.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÜERA, A.; CONTRERAS, M.; CRESPO, J.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Multiresidue method for the analysis of multiclass pesticides in agricultural products by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **The Analyst**, **127**: 347-354, 2002.

AHMED, F. E. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. **Trends in Analytical Chemistry**, **20(11)**: 649-661, 2001.

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.

ANGERER, J. & RITTER, A. Determination of metabolites of pyrethroids in human urine using solid-phase extraction and gas chromatography – mass spectroscopy. **Journal of Chromatography B**, **695**: 217-226, 1997.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>> Acesso em: 06 de outubro de 2005a.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Controlando agrotóxicos nos alimentos: o trabalho desenvolvido pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AC, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SP, TO, a FIOCRUZ/INCQS e os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED, LACEN/PR E ITEP/PE. Relatório de atividades 2001-2004, Brasília, 2005b.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, 2003. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)> Acesso em: 14 de agosto de 2006.

ARAÚJO, S. M. M.; LEMOS, R. N. S.; QUEIROZ, M. E. R.de; NUNES, G. S. Uso de inseticidas organofosforados nos pólos de produção na ilha de São Luís (MA): condições de trabalho e contaminação de hortaliças. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, **11**: 159-179, 2001.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas o homem e o meio ambiente**. Editora UFV, Viçosa, MG, 2004.

BARRIONUEVO, R. W. & LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida e microextração em fase sólida de piretróides em água. **Química Nova**, **24(2)**: 172-175, 2001.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Editora da Unicamp, Campinas, SP, 2001.

BELTRAN, J.; LÓPEZ, F. J.; HERNÁNDEZ, F. Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. **Journal of Chromatography A**, **885**: 389-404, 2000.

BERNAL, J. L.; NOZAL, M<sup>a</sup>. J., JIMÉNEZ, J. J.; RIVERA, J. M<sup>a</sup>. Matrix effects in the determination of acaricides and fungicides in must by gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection. **Journal of Chromatography A**, **778**: 111-117, 1997.

CABRAS, P.; ANGIONI, A.; MELIS, M.; MINELLI, E. V.; PIRISI, F. M. Simplified multiresidue method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. **Journal of Chromatography A**, **761**: 327-331, 1997.

CARDOSO, M. H. W. M.; BASTOS, L. H. P.; NEVES, T. S.; ABRANTES, S. Implementação da técnica de extração de dispersão da matriz em fase sólida ("MSPD") para determinação de resíduos de agrotóxicos em laranjas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos – Campinas, 24(2):** 298-301, 2004.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Editora da Unicamp, 7ª ed. Campinas, SP, 1997.

COLUMÉ, A.; CÁRDENAS, S.; GALLEGU, M.; VALCÁRCEL, M. Semiautomatic multiresidue gas chromatographic method for the screening of vegetables for 25 organochlorine and pyrethroid pesticides. **Analytica Chimica Acta, 436:** 153-162, 2001.

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

DÓREA, H. S. & LOPES, W. G. Aplicação da técnica de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) na análise de pesticidas em quiabo por CG-EM. **Química Nova, 27(6):** 892-896, 2004.

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.

ETN - Extension Toxicology Network. Pesticide Information Profiles: Chlorpyrifos. June, 1996. Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/chlorpyr.htm>> Acesso em: 20 de novembro de 2006.

ETN - Extension Toxicology Network. Pesticide Information Profiles: Lambda Cyhalothrin. June, 1996. Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/lambdacy.htm>> Acesso em: 20 de novembro de 2006.

FAKATA, K. L.; SWANSON, S. A.; VORCE, R. L.; STEMMER, P. M. Pyrethroid insecticides as phosphatase inhibitors. **Biochemical Pharmacology**, **55**: 2017-2022, 1998.

FARIA, A. M. **Dissulfoton: Avaliação da mobilidade e extração ponto nuvem**. 2003. 121f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2003.

FERREIRA, A. B. H. **Mini Aurélio**. Editora Nova Fronteira, 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, RJ, 2000.

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.

GARCIA, J. S. **Otimização de misturas de coagulantes para a remoção de cádmio, cobre e chumbo em sistema aquoso por coprecipitação**. 2003. 63f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2003.

GARP - Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas. Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (apostila), 1999.

GOBO, A. B.; KURZ, M. H. S.; PIZZUTTI, I. R.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Development and validation of methodology for the determination of residues of organophosphorus pesticides in tomatoes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, **15(6)**: 945-950, 2004.

GORENSTEIN, O. Monitoramento de resíduos de agrotóxicos em frutas e hortaliças frescas comercializadas na CEAGESP: análise de resultados de 2003. **Informações Econômicas - São Paulo**, **34(10)**: 34-42, 2004.

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

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.

HIRAHARA, Y.; KIMURA, M.; INOUE, T.; UCHIKAWA, S.; OTANI, S.; HAGANUMA, A.; MATSUMOTO, N.; HIRATA, A.; MARUYAMA, S.; IIZUKA, T.; UKYO, M.; OTA, M.; HIROSE, H.; SUZUKI, S.; UCHIDA, Y. Validation of multiresidue screening methods for the determination of 186 pesticides in 11 agricultural products using gas chromatography (GC). **Journal of Health Science**, **51(5)**: 617-627, 2005.

HIRATA, R. Piretróides: estrutura química - atividade biológica. **Química Nova**, **18(4)**: 368-374, 1995.

IMA – Instituto Mineiro de Agropecuária. Informação pessoal.

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

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

JIMÉNEZ, J. J.; BERNAL, J. L.; NOZAL, M<sup>a</sup>. J.; TORIBIO, L.; MARTÍN, M<sup>a</sup>. T. Gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection in the analysis of pesticides in honey after elution from a Florisil

column/Influence of the honey matrix on the quantitative results. **Journal of Chromatography A**, **823**: 381-387, 1998.

JUHLER, R. K. Optimized method for the determination of organophosphorus pesticides in meat and fatty matrices. **Journal of Chromatography A**, **786**: 145-153, 1997.

KAIPPER, B. I. A.; MADUREIRA, L. A. S.; CORSEUIL, H. X. Use of activated charcoal in a solid-phase extraction technique. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, **12 (4)**: 514-518, 2001.

KORN, M.; PEREIRA, M. G.; BORGES, S. S. Algumas aplicações analíticas dos ultra-sons. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, **96**: 51-56, 2005.

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

LAMBROPOULOU, D. A. & ALBANIS, T. A. Headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry for the rapid screening of organophosphorus insecticide residues in strawberries and cherries. **Journal of Chromatography A**, **993**: 197-203, 2003.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. Editora Acta, 1<sup>a</sup> ed. São Carlos, SP, 1993.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. Editora Rima, São Carlos, SP, 2004.

LENTZA-RIZOS, C.; AVRAMIDES, E. J.; CHERASCO, F. Low-temperature clean-up for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. **Journal of Chromatography A**, **912**: 135-142, 2001.

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

MALVONI, M. Q.; SILVA, E. C. da; MENDONÇA, R. S. de; MACIEL, G. M. Ocorrência e entomofauna em cultivares de batata cultivadas na região da Alfenas-MG (2004). Disponível em: <<http://www.unifenas.br/neol/pdfs/entomofauna.pdf>> Acessado em: 20 de fevereiro de 2006.

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.

MIYAMOTO, J.; KANEKO, H.; TSUJI, R.; OKUMO, Y. Pyrethroids, nerve poisons: how their risks should be assessed to human health. **Toxicology Letters**, **82/83**: 933-940, 1995.

MORENO, J. L. F.; LIÉBANAS, F. J. A.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. Evaluation of different sample treatments for determining pesticide residue in fat vegetable matrices like avocado by low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, **1111**: 97-105, 2006.

NAKANO, O.; ROMANO, F. C. B.; PESSINI, M. M. O. **Pragas do solo**. Editora ESALQ/USP, Piracicaba, SP, 2001.

NASCENTES, C. C.; KORN, M.; SOUSA, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Use of ultrasonic baths for analytical applications: a new approach for optimisation conditions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, **12 (1)**: 57-63, 2001.

NUNES, G. S.; SANTOS, T. C. R.; BARCELÓ, D.; PIMENTA, A. S.; RIBEIRO, M. L. Extração por fluido supercrítico de alguns inseticidas carbamatos em amostras de batata, com determinação por HPLC/fluorescência e confirmação por HPLC/espectrometria de massa. **Química Nova**, **25 (2)**: 214-220, 2002.

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

PENA, M. F.; AMARAL, E. H.; SPERLING, E.V.; CRUZ, I. Método para determinação de resíduos de clorpirifós em alface por cromatografia a líquido de alta eficiência. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, **13**: 37-44, 2003a.

PENA, M. F.; CRUZ, I.; SPERLING, E. V. Alimentos saudáveis ou contaminados por resíduos de agrotóxicos. In: 22º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2003, Joinville, SC. III-003, 2003b. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/abes22/d.pdf>> Acesso em: 20 de novembro de 2006.

PERES, T. B.; PAPINI, S.; MARCHETTI, M.; NAKAGAWA, L. E.; MARCONDES, M. A.; ANDRÉA, M. M.; LUCHINI, L. C. Métodos de extração de agrotóxicos de diversas matrizes. **Arquivos do Instituto Biológico - São Paulo**, **69(4)**: 87-94, 2002.

PICANÇO, M. C.; FERNANDES, F. L.; ARAÚJO, C. de; FODELIS, E. G.; MORENO, S. C. Manejo integrado de pragas da cultura da batata. V Seminário Mineiro de Bataticultura, 2004.

QUEIROZ, S. C. N. **Determinação multirresíduos de pesticidas em água por cromatografia líquida de alta eficiência com ênfase em detecção por espectrometria de massas e novos sorventes para extração em fase sólida**. 153f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2001.

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.

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.

SCHENCK, F. J. & LEHOTAY, S. J. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residue in food? **Journal of Chromatography A**, **868**: 51-61, 2000.

SHULING, S.; XIAODONG, M.; CHONGJIU, L. Multi-residue determination method of pesticides in leek by gel permeation chromatography and solid phase extraction followed by gas chromatography with mass spectrometric detector. **Food Control**. Article in press, 2006.

SILVA, F. C.; CARDEAL, Z. L.; CARVALHO, C. R. Determinação de pesticidas organofosforados em água usando microextração em fase sólida e CGAR-EM. **Química Nova**, **22(2)**: 197-200, 1999.

SILVA, J. J. O.; ALVES, S. R.; MEYER, A.; PEREZ, F.; SARCINELLI, P. N.; MATTOS, R. C. C.; MOREIRA, J. C. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Revista da Saúde Pública**, **35(2)**: 130-135, 2001.

SIMPLÍCIO, A. L. & BOAS, L. V. Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. **Journal of Chromatography A**, **833**: 35-42, 1999.

ŠTAJNBAHER, D. & ZUPANČIČ-KRALJ, L. 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.

TEIXEIRA, C. F.; AUGUSTO, L. G. S.; MORATA, T. Saúde auditiva de trabalhadores expostos a ruído e inseticidas. **Revista da Saúde Pública**, **37(4)**: 417-423, 2003.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, **23(4)**: 523-530, 2000.

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**. No prelo.

WHO - World Health Organization. Data Sheets on Pesticides 18, Chlorpyrifos. Genebra, 1975. Disponível em: <[http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest18\\_e.htm](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest18_e.htm)> Acesso em: 03 de março de 2006.

WHO - World Health Organization. Environmental Health Criteria 82, Cipermetrin. Genebra, 1989. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc82.htm>> Acesso em: 03 de março de 2006.

WHO - World Health Organization. Environmental Health Criteria 97, Deltamethrin. Genebra, 1990. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc97.htm>> Acesso em: 03 de março de 2006.