

GEVANY PAULINO DE PINHO

**EFEITO DE COMPONENTES DA MATRIZ NA
ANÁLISE DE AGROTÓXICOS POR
CROMATOGRAFIA GASOSA**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009**

GEVANY PAULINO DE PINHO

**EFEITO DE COMPONENTES DA MATRIZ NA
ANÁLISE DE AGROTÓXICOS POR
CROMATOGRÁFIA GASOSA**

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

APROVADA: 24 de abril de 2009

Prof^ª. Carol Hollingworth Collins

Prof. Maurício Xavier Coutrim

Prof. César Reis
(Co-orientador)

Prof^ª. Maria Eliana Lopes Ribeiro de
Queiroz
(Co-orientador)

Prof. Antônio Augusto Neves
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, que em todos os momentos me fez sentir a sua presença. E por tudo que Ele tem me proporcionado e em especial pelo que não sou capaz de reconhecer.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao professor Antônio Augusto Neves, por sua orientação e segurança em momentos de dificuldade demonstrada ao longo deste trabalho.

À professora Maria Eliana por sua orientação e confiança demonstrada ao longo deste trabalho.

Ao técnico Ricardo pela disposição em ajudar sempre que se fez necessário.

A minha família que mesmo distante sempre foi presença viva nos momentos de dificuldade.

E, principalmente ao Flaviano, meu melhor amigo e também esposo, que

em todos os momentos me apoiou com seu terno ombro e aconchegante colo.

A todos os colegas de laboratório que, direta ou indiretamente, contribuíram de forma positiva para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

GEVANY PAULINO DE PINHO, filha de Joaquim Brant de Pinho e Zenity Maria Paulino Brant, nasceu em Francisco Sá, Minas Gerais, em 19 de outubro de 1980.

Em abril de 2001, iniciou o Curso de Graduação em Química pela Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se como licenciada em janeiro de 2005. Em fevereiro deste mesmo ano, 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. Em março de 2007 iniciou as atividades do doutorado no mesmo programa de pós-graduação e submetendo-se à defesa de tese após 26 meses (abril de 2009).

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxiv
Capítulo 1 - Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa.	1
1.1. Introdução.....	1
1.2. Aspectos históricos	3
1.3. Fatores que influenciam no efeito de matriz	4
1.3.1. Injetor.....	4
1.3.2. Coluna cromatográfica e detector.....	7
1.3.3. Propriedades dos agrotóxicos.....	9
1.3.4. Propriedades da matriz.....	11
1.3.5. Concentração dos agrotóxicos.....	12

1.4. Métodos para minimizar o efeito de matriz.....	14
1.4.1. Curva analítica da matriz.....	14
1.4.2. Formas de injeção.....	16
1.4.3. Analitos protetores.....	17
1.4.4. Limpeza dos extratos.....	19
1.4.5. Função de correção.....	21
1.4.6. Método de adição de padrão.....	24
1.5. Conclusão.....	24
1.6. Referências bibliográficas.....	25
Capítulo 2 – Influência dos componentes do tomate na adsorção de agrotóxicos em análises por cromatografia gasosa.....	29
2.1. Introdução.....	29
2.2. Materiais e Métodos.....	30
2.2.1. Reagentes.....	30
2.2.2. Equipamentos e condições de análises.....	31
2.2.2.1. Equipamentos de laboratório.....	31
2.2.2.2. CG-DCE.....	31
2.2.3. Procedimento analítico.....	31
2.2.3.1. Preparo do extrato orgânico da amostra de tomate por extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura - ESL-PBT.....	31
2.2.3.2. Adição de carvão ativo à amostra submetida a ESL-PBT.....	32
2.2.3.3. Resposta cromatográfica após a saturação do sistema.....	32
2.2.3.4. Curvas analíticas.....	32
2.2.3.5. Efeito da variação da concentração da deltametrina na quantificação do clorpirifós.....	33
2.2.3.6. Efeito das quantidades de extrato da matriz na quantificação da deltametrina.....	33
2.3. Resultados e discussão.....	34
2.3.1. Adição de carvão ativo à amostra.....	34
2.3.2. Resposta cromatográfica após a saturação do sistema.....	35
2.3.3. Curvas analíticas.....	37
2.3.4. Efeito da variação da concentração da deltametrina na quantificação do clorpirifós.....	40

2.3.5. Efeito da quantidade de componentes da matriz na quantificação da deltametrina.....	42
2.4. Conclusão.....	43
5. Referências bibliográficas.....	45

Capítulo 3 - Avaliação da adsorção de agrotóxicos no injetor e na coluna durante análises por cromatografia gasosa.....	47
3.1. Introdução.....	47
3.2. Materiais e Métodos.....	49
3.2.1. Reagentes.....	49
3.2.2. Cromatógrafo a gás com detector por captura de elétrons - CG-DCE.....	49
3.2.3. Adsorção do clorpirifós e deltametrina no sistema cromatográfico.	49
3.2.3.1. Adsorção dos agrotóxicos no injetor.....	49
3.2.3.1.1. Adsorção do clorpirifós.....	50
3.2.3.1.2. Adsorção da deltametrina.....	50
3.2.3.1.3. Avaliação da presença da deltametrina na detecção do clorpirifós.....	50
3.2.3.2. Adsorção do clorpirifós e deltametrina na coluna cromatográfica	50
3.3. Resultados e discussão.....	51
3.3.1. Adsorção do clorpirifós no injetor.....	51
3.3.2. Adsorção da deltametrina no injetor.....	53
3.3.3. Avaliação da presença da deltametrina na detecção do clorpirifós.	53
3.3.4. Adsorção do clorpirifós na coluna cromatográfica.....	54
3.3.5. Adsorção da deltametrina na coluna cromatográfica.....	56
3.4. Conclusão.....	57
3.5. Referências bibliográficas.....	59

Capítulo 4 - Otimização do método de extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT) para análise de agrotóxicos em amostras de mel por cromatografia em fase gasosa.....	60
4.1. Introdução.....	60
4.2. Materiais e Métodos.....	62
4.2.1. Reagentes.....	62
4.2.2. Otimização da ELL-PBT	62

4.2.3. Equipamentos de laboratório.....	64
4.2.4. CG-DCE.....	64
4.2.5. CG-EM.....	64
4.2.6. Validação do método.....	65
4.2.7. Aplicação da técnica em amostras de mel.....	65
4.3. Resultados e discussões.....	65
4.3.1. Otimização da ELL-PBT.....	65
4.3.1.1. Massa do mel.....	67
4.3.1.2. Processo de homogeneização.....	67
4.3.1.3. Limpeza com florisil.....	67
4.3.1.4. Mistura extratora.....	68
4.3.1.5. Força iônica.....	69
4.3.2. Validação do método	69
4.3.2.1. Seletividade.....	69
4.3.2.2. Limite de detecção, limite de quantificação e linearidade.....	70
4.3.2.3. Exatidão e precisão do método.....	71
4.3.3. Aplicação do método em amostras de mel.....	72
4.4. Conclusão.....	73
4.5. Referências bibliográficas.....	74
Capítulo 5 - Influência dos constituintes químicos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos.....	76
5.1. Introdução.....	76
5.2. Materiais e Métodos.....	78
5.2.1. Reagentes.....	78
5.2.2. Procedimento analítico.....	79
5.2.2.1. Preparo dos extratos orgânicos de amostras por extração sólido-líquido ou extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT ou ELL-PBT).....	79
5.2.3. Equipamentos e condições de análises.....	80
5.2.3.1. Equipamentos de laboratório.....	80
5.2.3.2. CG-DCE.....	81
5.2.4. Avaliação da resposta cromatográfica dos agrotóxicos após saturação do CG.....	81
5.2.5. Análise das Componentes Principais (ACP).....	81

5.2.6. Curvas analíticas.....	82
5.3. Resultados e discussão.....	82
5.3.1. Variação da resposta cromatográfica após saturação do CG.....	82
5.3.2. Curvas analíticas.....	85
5.3.2.1. Curvas analíticas preparadas em solvente.....	85
5.3.2.2. Curvas analíticas preparadas em extratos das matrizes.....	86
5.4. Conclusão.....	90
5.5. Referências bibliográficas.....	91
Conclusões gerais.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP	Análises das Componentes Principais
AHA	Análises Hierárquicas de Agrupamentos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Cromatografia Gasosa (ou Cromatógrafo a Gás)
CG-EM	Cromatografia Gasosa associada com Espectrometria de Massas (ou Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massas)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CP	Componentes Principais
DCE	Detector por Captura de Elétrons
DDT	DicloroDifenilTricloroetano
DFC	Detector Fotométrico de Chama
DMFS	Dispersão da Matriz em Fase Sólida
DNF	Detector Nitrogênio-Fósforo
DPR	Desvio-Padrão Relativo
EFS	Extração em Fase Sólida
ELL	Extração Líquido-Líquido
ELL-PBT	Extração Líquido-Líquido e Purificação em Baixa Temperatura

EM	Espectrômetro de Massas (ou Espectrometria de Massas)
ESL-PBT	Extração Sólido-Líquido e Purificação em Baixa Temperatura
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LD	Limite de Detecção
LMR	Limite Máximo de Resíduo
LQ	Limite de Quantificação
MIS	Monitoramento de Íons Seleccionados
RCA	Razão entre os Coeficientes Angulares
RCL	Razão entre os Coeficientes Lineares
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TPV	Temperatura Programada de Vaporização
t_R	Tempo de Retenção

LISTA DE TABELAS

	Tabela	Pág
Tabela 1.1.	Porcentagens de recuperação superiores a 100,0% para alguns agrotóxicos em diferentes matrizes	2
Tabela 1.2.	Aumento da resposta cromatográfica (padrão em extratos da matriz/padrão preparado em solvente puro x 100) na análise de agrotóxicos sulfurados em extratos de vagens utilizando os detectores fotométrico de chama (DFC) e espectrômetro de massas (EM) (Adaptado da referência 41)	8
Tabela 1.3.	Porcentagem de recuperação utilizando DCE na quantificação de agrotóxicos em extratos de laranja, na faixa de concentração 0,011 – 0,101 mg kg ⁻¹ e o DNF na quantificação de agrotóxicos em extratos de laranja, na faixa de concentração 0,0176 – 0,382 mg kg ⁻¹ (Adaptado da referência 7)	9

Tabela 1.4.	Efeito de matriz observado em análises de agrotóxicos organofosforados em extratos de leite e manteiga usando a injeção sem divisor de fluxo para introdução da amostra no CG (Adaptado da referência 24)	12
Tabela 1.5.	Porcentagem de recuperação de agrotóxicos obtidos utilizando curva analítica preparada em solvente puro para amostras de tomate em diferentes concentrações (Adaptado da referência 9)	13
Tabela 1.6.	Quantificação de agrotóxicos em batata por CG-EM, utilizando solução-padrão dos agrotóxicos preparada em solvente puro e em extratos de batata (branco) (Adaptado da referência 25)	15
Tabela 1.7.	Aumento da resposta cromatográfica (solução-padrão preparada em extratos da matriz/solução-padrão preparada em solvente x100) na recuperação de agrotóxicos, usando CG-DFC na análise de extratos de maçã, com o uso do método oficial de extração, seguido por limpeza com EFS para agrotóxicos (0,070 – 0,600 mg kg ⁻¹) (Adaptado da referência 41)	20
Tabela 2.1.	Volumes de acetonitrila e do extrato orgânico de amostra de tomate usados na diluição de solução de deltametrina a 500 µg L ⁻¹ na obtenção de 5,00 mL de solução a 50 µg L ⁻¹	34
Tabela 2.2.	Razão entre os coeficientes angulares e razão entre os coeficientes lineares das curvas analíticas obtidas em extratos da matriz e em solvente puro	40
Tabela 3.1.	Programações de temperatura da coluna cromatográfica utilizadas para estudar a adsorção de clorpirifós e deltametrina na coluna e seus respectivos tempo de análise e tempo de retenção dos agrotóxicos	55
Tabela 4.1.	Variáveis avaliadas no processo de otimização	63

univariada da ELL-PBT de agrotóxicos em amostras de mel

Tabela 4.2.	Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade do método	71
Tabela 4.3.	Porcentagens de recuperação dos quatro agrotóxicos, após extração da amostra de mel fortificadas em quatro concentrações diferentes	71
Tabela 5.1.	Descrição do preparo dos extratos de nove matrizes empregando a ELL-PBT ou ESL-PBT: quantidade de amostra, composição da mistura extratora e forma de homogeneização	80
Tabela 5.2.	Porcentagens de variação das respostas cromatográficas dos agrotóxicos obtidas após a saturação do CG-DCE com nove extratos de matriz	82
Tabela 5.3.	Razão entre os coeficientes angulares (RCA) e lineares (RCL) das curvas analíticas obtidas em extratos da matriz e em solvente puro	87

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1.1. Estruturas dos organofosforados: acefato e metamidofós.	4
Figura 1.2. Possíveis adsorções que ocorrem na superfície do vidro e lã de vidro do insertor em uma injeção com divisão do fluxo (<i>split</i>). A) Agrotóxicos preparados em solvente puro. B) Agrotóxicos preparados em extratos da matriz (branco).	6
Figura 1.3. Estruturas químicas de agrotóxicos organofosforados. A) agrotóxicos em que o efeito de matriz é pouco pronunciado, B) agrotóxicos que são susceptíveis ao efeito de matriz.	10
Figura 1.4. Espectros de absorção dos extratos obtidos a partir da ESL-PBT de amostras de tomate isentas de agrotóxicos (branco) com a adição de 0, 5, 10, 15 mg de carvão ativo.	21

- Figura 1.5. Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos clorpirifós, cipermetrina, λ -cialotrina e deltametrina com a adição de 0, 5, 10 e 15 mg de carvão ativado durante o processo de extração empregando a técnica ESL-PBT. 21
- Figura 1.6. (A) Curvas analíticas preparadas em acetonitrila e em extratos de tomate para a deltametrina. (B) Curvas analíticas preparadas em acetonitrila e em extratos de solo para o thiatomexan. (C) Curvas analíticas preparadas em acetonitrila e em extratos de batata para o thiatomexan. 22
- Figura 2.1. Espectros de absorção dos extratos orgânicos obtidos a partir da ESL-PBT de amostras de tomate isento de agrotóxicos, sem adição de carvão ativo e com adição de 15 mg de carvão ativo. 35
- Figura 2.2. Porcentagem de aumento da resposta atribuída aos agrotóxicos ($50,0 \mu\text{g L}^{-1}$) após a saturação do sistema cromatográfico com extratos orgânicos de amostras de tomate, com e sem utilização do padrão interno nos cálculos. 36
- Figura 2.3. Cromatograma da solução padrão de $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ dos agrotóxicos, em que: $t_R=5,7$ min: clorpirifós, $t_R=9,8$ min: bifentrina (padrão interno), $t_R=10,8$ min: λ -cialotrina, $t_R=12,4$ min: cipermetrina e $t_R=14,1$ min: deltametrina. 37
- Figura 2.4. Curvas analíticas construídas a partir de soluções de agrotóxicos preparadas em acetonitrila (___) e em extrato da matriz (----): A) clorpirifós, B) λ -cialotrina, C) cipermetrina, D) deltametrina. 38

Figura 2.5.	Porcentagem de aumento da resposta cromatográfica dos agrotóxicos clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina quando preparados em soluções com extratos de tomate em relação às preparadas em solvente puro nas concentrações de 5, 10, 20, 50, 100, 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.	40
Figura 2.6.	Estruturas químicas de piretroides e o organofosforado clorpirifós.	41
Figura 2.7.	Área média do clorpirifós a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ obtido em análise cromatográfica na presença de diferentes concentrações de deltametrina (0, 20, 50, 100, 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) para 5,0 mL de solução.	42
Figura 2.8.	Resposta cromatográfica da deltametrina a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ variando a quantidade de componentes da matriz (0, 1, 2, 3 e 4 mL de extrato orgânico obtido de amostra de tomate) para 5,0 mL de solução.	43
Figura 3.1.	Curvas analíticas de soluções-padrão de clorpirifós, preparadas em acetonitrila, na faixa de concentração de 5 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e analisadas por CG-DCE com o injetor nas temperaturas: 310 (___); 280 (----) e 250 °C (_ _ _).	51
Figura 3.2.	Cromatogramas de solução padrão de clorpirifós a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ obtidos a partir das análises realizadas com o injetor 310, 280, 250, 200, 170 e 150 °C.	52
Figura 3.3.	Curvas analíticas de soluções padrão de deltametrina, preparadas em acetonitrila, na faixa de concentração de 5 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, e analisadas por CG-DCE com o injetor nas temperaturas: 310 (_ _ _); 280 (-----); e 250 °C (___).	53

- Figura 3.4. Porcentagem de variação da área atribuída ao clorpirifós e ao clorpirifós na presença da deltametrina, em diferentes concentrações, obtida a partir de análises realizadas com o injetor a 250 e 310 °C [$(\bar{A}_{310} - \bar{A}_{250})/\bar{A}_{250} \times 100$]. 54
- Figura 3.5. Porcentagem de variação da área atribuída ao clorpirifós e ao clorpirifós com presença da deltametrina, em diferentes concentrações, obtida a partir de análises realizadas com a taxa de aquecimento da coluna a 10 e 30 °C min⁻¹ [% = $(\bar{A}_{10} - \bar{A}_{30})/\bar{A}_{30} \times 100$]. 56
- Figura 3.6. Porcentagem de variação da área atribuída à deltametrina, em diferentes concentrações, obtida a partir de análises realizadas com a taxa de aquecimento da coluna a 10 e 30 °C min⁻¹ [$\bar{A}_{10} - \bar{A}_{30})/\bar{A}_{30} \times 100$]. 57
- Figura 4.1. Porcentagem de extração de agrotóxicos obtidas na otimização de cinco variáveis da técnica de ELL-PBT para determinação de agrotóxicos em amostras de mel: a) massa de mel, b) procedimento de homogeneização, c) massa de florisil para limpeza, d) fase extratora e) força iônica. 66
- Figura 4.2. Cromatogramas obtidos após a ELL-PBT e limpeza utilizando diferentes quantidades de florisil de amostras de mel (isentas de agrotóxicos): A) 0g; B) 1g; C) 2g. 68
- Figura 4.3. Cromatograma de solução padrão dos agrotóxicos em acetonitrila a 50 µg L⁻¹. Os números dos picos (1, 2, 3, 4 e 5) se referem aos compostos clorpirifós, bifentrina (padrão interno), λ-cialotrina, cipermetrina, deltametrina, respectivamente. 70

- Figura 4.4. Cromatogramas de extrato obtido a partir da ELL-PBT de amostra de mel contaminada com resíduo de clorpirifós: A) Análise por CG-DCE; B) Análise por CG-EM no modo SIM; C) Espectro de massas do clorpirifós. 72
- Figura 5.1. Escores normalizados (A) e pesos (B) de amostras (1-9) como função da variação da resposta cromatográfica dos agrotóxicos (A. clorpirifós, B. λ -cialotrina, C. cipermetrina e D. deltametrina). As identificações das amostras estão na Tabela 5.1. 83
- Figura 5.2. Dendrograma construído com os dados autoescalados da variação da resposta dos agrotóxicos após saturação do CG. A identificação das amostras enumeradas de 1 a 9 estão na Tabela 5.1. 85
- Figura 5.3. Coeficientes de variação das áreas (agrotóxico/padrão interno) dos agrotóxicos clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, analisados em nove dias diferentes, nas concentrações 5; 20; 50; 100; 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. 86
- Figura 5.4. Porcentagem de variação da resposta cromatográfica dos agrotóxicos clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina quando preparados em extratos (tomate, leite, maçã, mel, solo, batata, fígado, alcatra e água) em relação às preparadas em solvente puro nas concentrações de 5, 10, 20, 50, 100, 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. 88

RESUMO

PINHO, Gevany Paulino de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Abril de 2009. **Efeito de componentes da matriz na análise de agrotóxicos por cromatografia gasosa.** Orientador: Antônio Augusto Neves. Co-orientadores: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e César Reis.

O presente trabalho teve como objetivo estudar sistematicamente o efeito de matriz na quantificação dos agrotóxicos clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina durante análises por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons. O efeito de matriz é atribuído à presença de coextrativos na fase orgânica obtida no processo de extração. Neste trabalho, o fenômeno “efeito de matriz”, é descrito em detalhes numa revisão que aborda os aspectos qualitativos e quantitativos do mesmo bem como as técnicas utilizadas para minimizá-lo. São relatados também alguns resultados que quantificam a interferência dos coextrativos na resposta cromatográfica para os quatro agrotóxicos. Observou-se para esses compostos um efeito de matriz positivo após a saturação do CG com várias injeções de extratos orgânicos de tomate. Verificou-se também que quanto maior o tempo de retenção, maior o efeito de matriz (clorpirifós: 10%, λ -cialotrina :103% e cipermetrina: 162%; deltametrina: 300%), e que o uso do padrão interno minimiza o efeito, mas não

o elimina. Um estudo detalhado da adsorção de clorpirifós e deltametrina no injetor e coluna cromatográfica foi realizado. Estes agrotóxicos foram os que apresentaram menor e maior efeito de matriz, respectivamente, nos estudos prévios. A capacidade dos agrotóxicos clorpirifós e deltametrina serem adsorvidos no injetor e na coluna cromatográfica foi avaliada construindo-se três isotermas com o injetor em 310, 280 e 250 °C, modificando a taxa de aquecimento da coluna para 10 e 30 °C min⁻¹, para uma faixa de concentração dos agrotóxicos entre 5 e 500 µg L⁻¹. Os resultados mostraram que quanto maior a temperatura do injetor (310 °C) e menor taxa de aquecimento da coluna cromatográfica (10 °C min⁻¹) menor é a adsorção dos agrotóxicos no sistema cromatográfico. Os resultados também mostraram que a deltametrina pode apresentar características de analito protetor, diminuindo a adsorção do clorpirifós nas análises de soluções padrão destes analitos em solvente puro. Um método simples e prático para identificação e quantificação do clorpirifós, λ-cialotrina, cipermetrina e deltametrina em amostras de mel também foi otimizado e validado. O método se baseia na extração líquido-líquido e purificação em baixa temperatura utilizando como mistura extratora acetonitrila:acetato de etila (6,5 mL:1,5 mL). Uma etapa adicional de *clean up* foi realizada com 2,0 g de florisil antes da análise por cromatografia gasosa. A técnica mostrou-se com eficiência satisfatória (> 85%) e a resposta cromatográfica foi linear, para os quatro agrotóxicos, na faixa de 0,033 – 0,17 µg g⁻¹, com coeficientes de correlação superiores a 0,99. Os limites de detecção e quantificação foram inferiores a 0,017 e 0,033 µg g⁻¹, respectivamente. O método proposto foi aplicado em 11 amostras de mel sendo detectados resíduos de clorpirifós e λ-cialotrina em duas amostras, em concentrações próximas ao limite máximo de resíduo estabelecido para produtos alimentícios. A presença destes compostos foi confirmada por espectrometria de massas com monitoramento de íons selecionados (CG-EM-MIS). Finalmente, estudou-se a influência dos constituintes químicos de nove matrizes (mel, tomate, leite, maçã, solo, batata, fígado, alcatra e água) na quantificação dos quatro agrotóxicos por CG-DCE. Para isso, extratos orgânicos de cada matriz foram obtidos a partir da ELL-PBT ou ESL-PBT e, posteriormente, utilizados para saturar o sistema cromatográfico. Solução padrão dos agrotóxicos foi injetada antes e após a saturação do CG com extratos de cada matriz. A variação da resposta cromatográfica foi avaliada

utilizando análises das componentes principais (ACP) e análises hierárquicas de agrupamentos (AHA). Os resultados mostraram que os constituintes de extratos orgânicos de tomate foram os responsáveis pelo maior efeito de matriz nas respostas cromatográficas dos piretroides em análises por CG-DCE (100 a 300%). Isso foi verificado pela análise das componentes principais, avaliando o distanciamento da resposta obtida para o extrato orgânico das amostras de tomate das demais respostas. Além disso, a saturação do sistema cromatográfico com extratos de água, solo, maçã e mel diminuíram a resposta cromatográfica dos piretroides.

ABSTRACT

PINHO, Gevany Paulino de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2009. **Effect of components of the matrix in pesticide analysis by gás chromatography.** Adviser: Antônio Augusto Neves. Co-advisers: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz and César Reis.

This work aimed to systematically study the matrix effect on the measurement of pesticides chlorpyrifos, λ -cyhalothrin, cypermethrin and deltamethrin by gas chromatography with electron capture detector. The matrix effect is attributed to the presence of co-extractives in the organic phase during extraction. In this work, the phenomenon matrix effect is described in detail in a review discussing qualitative and quantitative aspects as well as techniques used to minimize it. Also reports results that quantify co-extractive interference with the chromatographic response of the four pesticides. There was a positive matrix effect after GC saturation with multiple injections of tomato organic extracts for the four pesticides. It was also found that the longer the retention time, the greater the matrix effect (10% for chlorpyrifos, 103% for λ -cyhalothrin, 162% for cypermethrin and 300% for deltamethrin), and that the internal standard minimizes the effect, but not eliminate it. An in-depth study of chlorpyrifos and deltamethrin adsorption on the injector and chromatography

column was carried out. These were the pesticides that showed the lowest and greatest matrix effect, respectively, in previous studies. The capacity of chlorpyrifos and deltamethrin being adsorbed in the injector and chromatography column was assessed by plotting three isotherms with the injector at 310, 280 and 250°C and modifying the heating rate of the column to 10 and 30 °C min⁻¹. For a range of concentrations between 5 and 500 µg L⁻¹, the results showed that the higher the injector temperature (310 °C) and the lower the heating rate of the chromatography column (10 °C min⁻¹), the lower is the pesticide adsorption in the chromatography system. The results also showed that deltamethrin may present characteristics of protective analyte, reducing chlorpyrifos adsorption in the analysis of analyte standard solutions in pure solvent. A simple and practical method for identification and quantification of chlorpyrifos, λ-cyhalothrin, deltamethrin and cypermethrin in honey samples was also optimized and validated. The method is based on liquid-liquid extraction and purification at low temperature using the extractor mixture acetonitrile:ethyl acetate (6.5 mL: 1.5 mL). An additional clean-up step was performed with 2.0 g of florisil before analysis by gas chromatography. The efficiency of the technique was shown to be satisfactory (> 85%) and chromatographic response was linear for all pesticides in the range 0.033 - 0.17 µg g⁻¹, with correlation coefficients above 0.99. Limits of detection and quantification were below 0.017 and 0.033 µg g⁻¹ respectively. The proposed method was applied to 11 honey samples and detected residues of chlorpyrifos and λ-cyhalothrin in two samples, at concentrations below the MRLs established for food products. The presence of these compounds was confirmed by mass spectrometry in the SIM mode (GC-MS-SIM). Finally, the influence of chemical constituents of nine matrices (honey, tomatoes, milk, apples, soil, potatoes, liver, rump meat and water) on the quantification of the pesticides by GC-ECD was studied. With this purpose, organic extracts of each matrix were obtained from LLE-LTP or SLE-LTP and used to saturate the chromatography system. Standard pesticide solutions were injected before and after GC saturation with extracts of each matrix. Variation of chromatographic responses was evaluated by principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA). Results showed that the constituents of tomato organic extracts accounted for the greatest matrix effect on pyrethroid chromatographic responses in GC-ECD analyses (100 to 300%). This was

confirmed by principal component analysis, which evaluated the distance of the response of tomato organic extracts from the other responses. Furthermore, the saturation of the chromatography system with extracts of water, soil, apple and honey decreased pyrethroid chromatographic responses.

CAPÍTULO 1

EFEITO DE MATRIZ NA QUANTIFICAÇÃO DE AGROTÓXICOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA

1.1. INTRODUÇÃO

Vários agrotóxicos são frequentemente empregados na agricultura para controle de pragas, uma vez que contribuem para aumentar a produtividade.^{1, 2} No entanto, resíduos desses compostos podem permanecer em alimentos, nos solos, na água, no ar, etc., o que é bastante prejudicial ao ser humano. Assim, é necessário seu monitoramento nas diversas matrizes ambientais, para evitar a contaminação do ser humano.³

A análise de resíduos de agrotóxicos consiste em cinco etapas básicas: extração do(s) analito(s) da matriz, remoção dos coextrativos (limpeza), separação, identificação e quantificação do(s) composto(s).⁴ Os métodos cromatográficos são os mais empregados nas três últimas etapas da análise de agrotóxicos, sendo a cromatografia em fase gasosa (CG) a mais utilizada para identificação e quantificação de compostos voláteis ou volatilizáveis.⁵

A cromatografia em fase gasosa destaca-se pela disponibilidade de uma gama de detectores (captura de elétrons, fotométrico de chama, espectrometria de massas, etc.) que permitem determinar agrotóxicos e/ou seus produtos de degradação em quantidades inferiores aos limites máximos de resíduos (LMR), estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).³ Além disso, essas análises geralmente são rápidas e possibilitam quantificar um grande número de agrotóxicos simultaneamente.⁶

Nesse sentido, a exatidão e a precisão dos resultados obtidos nas análises são imprescindíveis. Qualquer fonte de erros em potencial deve ser investigada e caracterizada, como o efeito de matriz durante as análises dos agrotóxicos. Esse efeito de matriz, também conhecido como “aumento da resposta cromatográfica induzida pela matriz”, é usado para explicar as taxas de recuperação de agrotóxicos que excederem 100,0% e a baixa precisão de resultados.⁷ Na Tabela 1.1, são apresentados alguns exemplos de resultados de análises de agrotóxicos com taxas de recuperação superiores a 100,0 %.

Tabela 1.1. Porcentagens de recuperação superiores a 100,0% para alguns agrotóxicos em diferentes matrizes

Agrotóxicos	Matrizes	% Rec.	Ref.
Captan	Mel	1028	8
Clorotalonil	Tomate	253	9
Fluvalinato	Sucos	403	10
Cipermetrina	Espinafre	147	11
DDT	plantas medicinais	124	12
Deltametrina	Alface	133	13

O efeito de matriz, além de gerar porcentagens de recuperação superiores a 100,0%, pode causar outras alterações na análise cromatográfica, como:

(1) mascaramento do pico do analito de interesse, gerando um resultado falso negativo. Isso ocorre, por exemplo, quando há perdas de quantidade do agrotóxico no sistema de injeção, fornecendo baixa resposta e dificultando a integração;¹⁰

(2) erro na identificação do analito, pois componentes da matriz podem ser erroneamente identificados como o analito de interesse quando, na verdade,

este está ausente, gerando resultado falso positivo. Este problema é mais fácil de ser contornado, com a utilização de um espectrômetro de massas para monitoramento dos analitos;^{7, 14}

(3) aumento no sinal do detector, levando à superestimação do resultado. Isso ocorre quando impurezas voláteis são eluídas com mesmo tempo de retenção dos agrotóxicos;¹⁵

(4) extinção do sinal no detector, ou seja, o sinal do analito é diminuído gerando uma subestimação do resultado, fato comum aos detectores fotométricos de chama.¹⁶

Embora este assunto seja bem conhecido pelos analistas que trabalham com cromatografia, ainda há uma carência de trabalhos sobre efeito de matriz na literatura, principalmente em português. Assim, este artigo tem como objetivo apresentar os principais fatores que contribuem para o efeito de matriz, bem como mostrar alternativas para eliminar ou minimizar este problema em análises de agrotóxicos por cromatografia em fase gasosa.

1.2. ASPECTOS HISTÓRICOS

Embora os primeiros trabalhos sobre a influência da matriz nas análises de agrotóxicos por cromatografia tenham sido publicados a partir de 1981,¹⁷⁻²³ considera-se que o efeito de matriz foi sistematicamente estudado pela primeira vez por Erney et al.²⁴ na análise de organofosforados em leite e manteiga por CG. Esses pesquisadores observaram que compostos similares ao acefato e ao metamidofós (Figura 1.1), quando preparados em solvente puro, adsorvem ou degradam no sistema de injeção, em razão do estresse térmico sofrido durante a análise por cromatografia em fase gasosa. Entretanto, quando injetados juntamente com os componentes da matriz (extratos), estes agrotóxicos apresentavam uma resposta mais alta quando comparada com as respostas de um padrão livre de componentes da matriz, ocorrendo, assim, uma superestimação dos resultados analíticos.

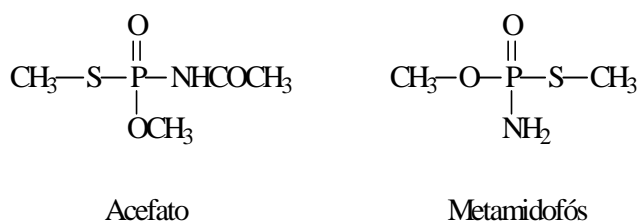


Figura 1.1. Estruturas dos organofosforados: acefato e metamidofós.

Além disso, esses autores verificaram que melhor precisão dos resultados era obtida após injeções sucessivas da solução-padrão preparada no extrato da matriz isenta dos agrotóxicos, ou seja, só se conseguia boa repetitividade dos resultados após a saturação do sistema cromatográfico com os componentes da matriz.²⁴

Em avaliação inicial do mecanismo do efeito de matriz, Erney et al. verificaram que fatores como tipo de matriz, concentração do agrotóxico na amostra, tipo de injetor e temperatura do sistema cromatográfico poderiam influenciar também nos resultados.²⁴ A partir desse estudo, realizaram-se novas pesquisas para identificar os fatores que influenciavam no efeito de matriz e as possíveis medidas a serem realizadas para minimizar os problemas.

1.3. FATORES QUE INFLUENCIAM NO EFEITO DE MATRIZ

O efeito de matriz é mais pronunciado em análises de amostras complexas, como frutas,^{25,26} vegetais,^{9,14} mel,^{8, 27} sucos,²⁸ vinhos,^{29, 30} óleo de oliva,³¹⁻³³ tecidos animais,³⁴ leite humano,³⁵ solos,^{36,37} etc. Os problemas gerados pelos componentes endógenos da matriz nas respostas do detector não dependem apenas das características dos compostos, mas também das próprias condições cromatográficas, particularmente no injetor, na coluna cromatográfica e no detector do CG.²⁴ Por isso, é necessário conhecer os componentes do aparelho e seu funcionamento, para adotar medidas preventivas ou corretivas, na tentativa de obter resultados confiáveis.

1.3.1. Injetor

A técnica de injeção a quente (com ou sem divisor de fluxo), em que a amostra é vaporizada no injetor, representa uma das estratégias mais

empregadas para introduzir a amostra de resíduos de agrotóxicos no CG.^{15,38-40} Isso se deve à facilidade de introdução da amostra no aparelho, ao uso de pequenos volumes de amostra e à possibilidade de análise de agrotóxicos em nível de traços.⁴⁰ Esta técnica, em que a introdução da amostra no aparelho é acompanhada pela sua vaporização, é a mais susceptível ao efeito de matriz. A amostra é exposta no injetor a uma temperatura alta e com tempo de residência suficiente para que sítios ativos do insertor (*liner* ou tubo de vidro) do injetor adsorvam ou induzam à degradação térmica de alguns analitos, antes de serem transferidos para a coluna.²⁴

Quando as soluções-padrão são preparadas em solvente puro e analisadas por cromatografia em fase gasosa, os sítios ativos do insertor estão disponíveis para a retenção dos analitos e, assim, menor quantidade é transferida para a coluna e conseqüentemente detectada (Figura 1.2A). Na análise do extrato da matriz contendo esses analitos, ocorre uma competição entre os componentes da matriz e os analitos pelos sítios ativos do insertor. À primeira vista, esse fenômeno é interessante, pois o insertor faz “uma limpeza” (*clean up*) da amostra, impedindo que maior quantidade de impurezas seja transferida para a coluna cromatográfica, aumentando seu tempo de vida útil. Essa competição entre os compostos pelos sítios ativos possibilita que maior quantidade de agrotóxico esteja disponível para ser introduzida na coluna cromatográfica e ser, conseqüentemente, detectada (Figura 1.2B).⁴¹ Quando a resposta do detector, atribuída ao analito, é comparada com a resposta de soluções-padrão do mesmo analito, ocorre uma superestimação dos resultados.

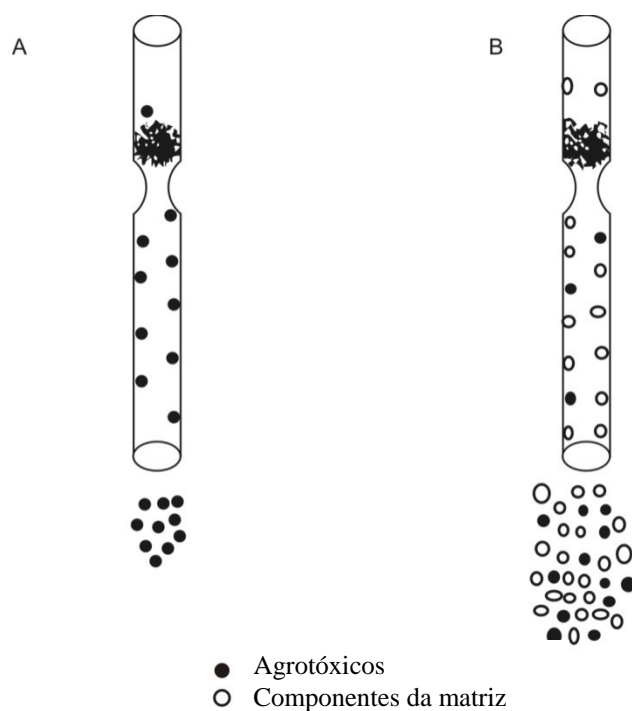


Figura 1.2. Possíveis adsorções que ocorrem na superfície do vidro e lã de vidro do insertor em uma injeção com divisão do fluxo (*split*). A) Agrotóxicos preparados em solvente puro. B) Agrotóxicos preparados em extratos da matriz (branco).

Os sítios ativos são formados por grupos silanóis livres e metais potencialmente presentes na superfície do insertor (tubo de vidro). Mesmo os insertores de alta qualidade classificados como “desativados” possuem estas características. Além disso, sítios ativos adicionais podem surgir a partir de coextrativos não voláteis que se depositam na entrada do sistema cromatográfico durante repetidas análises.¹⁵ Por isso, as respostas do detector não são constantes e são afetadas pelo uso histórico do injetor. Cada injeção anterior tem potencial de modificar a atividade do injetor pela própria deposição dos componentes da matriz no insertor. Desta forma, é natural que resultados diferentes sejam obtidos quando as análises são realizadas em diferentes laboratórios e sob diferentes condições cromatográficas.^{40, 42}

Mudanças na temperatura do injetor podem também afetar diferentemente o efeito de matriz. Em temperaturas mais altas, pode-se reduzir a adsorção tanto dos analitos como dos extrativos na superfície do insertor. Em

contrapartida, acelera também a decomposição de compostos termicamente lábeis.^{24, 40}

1.3.2. Coluna cromatográfica e detector

Embora existam poucos estudos na literatura sobre o efeito de matriz associado à coluna cromatográfica e ao tipo de detector, sabe-se que as conexões entre o injetor e a coluna, e as conexões entre coluna e detector podem também promover o efeito de matriz.⁴⁰

Quando uma nova coluna capilar é colocada no sistema cromatográfico, inicialmente pouco ou nenhum efeito de matriz é observado. Entretanto, o efeito de matriz nas análises aparece após algumas semanas de uso, em razão das sucessivas injeções e da conseqüente contaminação do sistema cromatográfico.⁴¹ Segundo Grob e Grob⁴³ a temperatura de eluição de substâncias polares diminui com o decréscimo da polaridade da coluna cromatográfica. Além disso, o diâmetro interno da coluna cromatográfica tem influência na magnitude do efeito de matriz em uma análise. Geralmente, colunas de maior diâmetro interno apresentam maiores distorções dos resultados em relação às de menores diâmetros.³⁹

O efeito matriz é mais perceptível em análises pelo espectrômetro de massas do que naquelas que usam detector fotométrico de chama, em função da detectabilidade (Tabela 1.2). Segundo Schenck e Lehotay⁴¹ a distinção dos resultados dos dois sistemas cromatográficos pode ser atribuída aos diferentes tipos de insertores utilizados e ao pequeno diâmetro da coluna utilizada no cromatógrafo a gás, acoplado ao espectrômetro de massas. O próprio espectrômetro de massas contribui para acentuar o efeito de matriz devido à superfície metálica do detector e por não sofrer nenhuma combustão.

Tabela 1.2. Aumento da resposta cromatográfica (padrão em extratos da matriz/padrão preparado em solvente puro x 100) na análise de agrotóxicos sulfurados em extratos de vagens utilizando os detectores fotométrico de chama (DFC) e espectrômetro de massas (EM) (Adaptado da referência 41)

Agrotóxicos	Detectores	Respostas relativas (%)
Fosmete	EM	640
	DFC	149
Malaoxon	EM	200
	DFC	118
Dicrotofós	EM	170
	DFC	129
Paraoxon	EM	144
	DFC	114
Carbofenotion sulfona	EM	150
	DFC	121

Comparando-se o efeito de matriz associado aos detectores, foram obtidos resultados mais exatos utilizando detector nitrogênio-fósforo (DNF) em relação ao detector por captura de elétrons (DCE) (Tabela 1.3).⁷ Essa diferença foi atribuída às maiores concentrações dos analitos usadas nas análises por CG-DNF, uma vez que o limite de detecção deste detector foi maior para alguns analitos. Nessa condição, a interferência dos componentes torna-se menos significativa nos resultados, gerando menor efeito de matriz.

Tabela 1.3. Porcentagem de recuperação, utilizando DCE na quantificação de agrotóxicos em extratos de laranja, na faixa de concentração 0,011 – 0,101 mg kg⁻¹ e o DNF na quantificação de agrotóxicos em extratos de laranja, na faixa de concentração 0,0176 – 0,382 mg kg⁻¹ (Adaptado da referência 7)

DCE		DNF	
Agrotóxicos	% Recuperação	Agrotóxicos	% Recuperação
Bromopropilato	135	Diazinon	102
λ -cialotrina	131	Diclorvós	104
Cipermetrina	112	Etion	104
Diclofluanide	131	Fenitroton	102
α - Endossulfam	105	Clorprofam	103
Endossulfam-sulfato	138	Clorpirifós	106
Fenvalerato	105	Clorpirifós-metil	103
Clorotalonil	224	Imalazil	45
Iprodione	114	Metalaxil	101
Lindane	103	Metamidofós	74
Permetrina	110	Paration	107
Procimidone	134	Pirimicarb	82
Tolilfluanida	122	Pirimifós-metil	104

1.3.3. Propriedades dos agrotóxicos

Compostos que não são afetados pelo efeito de matriz são considerados termicamente estáveis, apresentam um limitado potencial de adsorção no injetor em temperaturas elevadas, e a matriz é incapaz de providenciar um efeito protetor significativo.⁴⁰

As taxas de recuperação aparentemente mais altas e com baixa precisão são observadas em análises de agrotóxicos mais polares, sendo o grau de polaridade classificado de acordo com a solubilidade em água ou K_{ow} (coeficiente de partição octanol/água).⁴⁴ Compostos contendo grupamentos - P=O (organofosforados), -O-CO-NH- (carbamatos), -OH (hidroxilados), -N= (imidazoles e benzimidazoles), -NH-CO-NH- (derivados da uréia) são mais susceptíveis ao efeito de matriz.⁷

Schenck & Lehotay⁴¹ estudaram um grupo de organofosforados que apresentavam, em suas estruturas, ligações P=O e P=S. Dentre eles, havia aqueles cujas análises não apresentavam efeito de matriz significativo, como o paration e malation (Figura 1.3A) e outros que tinham elevado aumento das respostas, como paraoxon e malaoxon (Figura 1.3B). Apesar da semelhança entre as estruturas químicas, observaram que compostos mais polares e que continham ligações P=O exibiam maior efeito de matriz.

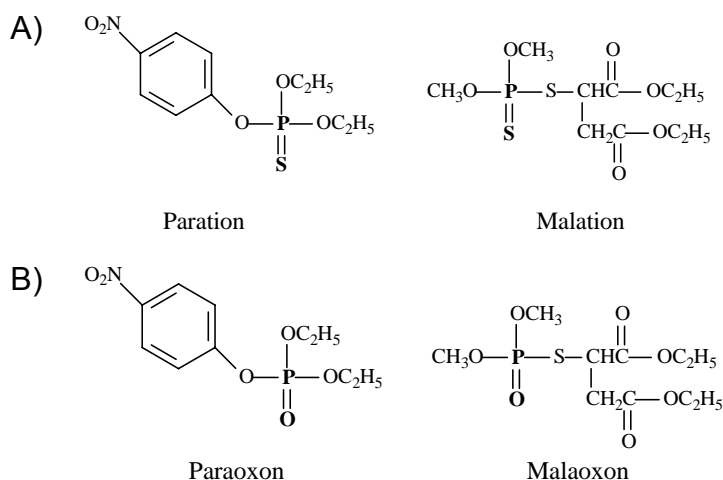


Figura 1.3. Estruturas químicas de agrotóxicos organofosforados. A) agrotóxicos em que o efeito de matriz é pouco pronunciado, B) agrotóxicos que são susceptíveis ao efeito de matriz.

Os piretroides, apesar de serem menos polares, apresentam efeito de matriz significativo. Neste caso, a elevada massa molar dos agrotóxicos (acima de 400 g mol^{-1}) dificulta a volatilização e menor quantidade de analito é introduzida na coluna cromatográfica quando preparado em solvente puro, produzindo menores respostas.¹⁰

Compostos hidrofóbicos, porém, como os agrotóxicos organoclorados, não apresentam efeito de matriz pronunciado. Estes compostos são menos susceptíveis à adsorção pelos sítios ativos do insertor. Uma exceção é o DDT, que pode ser termicamente degradado no injetor após acúmulo de coextrativos.¹⁰

Outra característica de alguns agrotóxicos é a susceptibilidade de sofrer degradação térmica quando analisados em solvente puro. Nesta condição, sinais destes compostos são apenas detectados. Entretanto, na presença dos

componentes da matriz, torna-se possível a integração dos picos para a quantificação.

1.3.4. Propriedades da matriz

A intensidade do efeito de matriz para dado agrotóxico é influenciada pela natureza da amostra e pelo tipo de coextrativos (tamanho das moléculas, polaridade, estabilidade térmica, volatilidade, etc.), como a análise de agrotóxicos em laranja, pois o alto conteúdo de óleos essenciais da matriz interfere significativamente na quantificação dos analitos.⁷ Coextrativos como lipídios (triacilgliceróis, fosfolipídios, etc.), alguns pigmentos (clorofila, carotenóides, etc.) e outros componentes de massa molar elevada (resina de plantas) também podem permanecer solubilizados nos extratos, mesmo após a purificação da amostra, promovendo o efeito de matriz nas análises cromatográficas.¹⁵

A influência da natureza da matriz foi observada também nas análises de organofosforados utilizando o modo de injeção sem divisor de fluxo. Esses compostos sofrem maior efeito de matriz quando analisados em extratos obtidos da manteiga do que obtidos de leite (Tabela 1.4).²⁴ Outro exemplo é o agrotóxico pirimicarbe cuja análise sofre um efeito de matriz similar em amostras de tomate e pimenta (taxa de recuperação 114,0% e 117,0%, respectivamente). No entanto, a análise desse composto em amostras de pepino não apresenta efeito de matriz (87,0%). Já na análise do clorotalonil observa-se efeito de matriz completamente diferente para as três matrizes, sendo o mais crítico o do tomate, em que foi encontrada taxa de recuperação superior a 250,0%.⁹

Tabela 1.4. Efeito de matriz observado em análises de agrotóxicos organofosforados em extratos de leite e manteiga usando a injeção sem divisor de fluxo para introdução da amostra no CG (Adaptado da referência 24)

Agrotóxicos	(Resposta do agrotóxico em extrato da matriz/ Resposta do agrotóxico em solvente) x100	
	Extratos de leite (%)	Extratos de manteiga (%)
Acefato	114	136
Ometoato	107	133
Diazinon	100	125
Dimetoato	106	131
Clorpirifós	104	107

1.3.5. Concentração dos agrotóxicos

O efeito de matriz é mais significativo na análise de agrotóxicos quando estes se encontram em concentrações mais baixas ou quando a proporção de componentes da matriz/analito é muito alta.⁷ Nessa situação, quando injetada a solução-padrão dos agrotóxicos preparados em solvente puro, em baixa concentração, uma quantidade expressiva do analito é retida na interface do insertor. Conseqüentemente, pequena quantidade de analito é detectada. Quando se analisam os extratos, apenas uma quantidade insignificante do analito é adsorvida, porque a proporção de componentes da matriz/analito é muito alta e os interferentes são preferencialmente adsorvidos. Este fato faz com que o efeito de matriz seja maior para os extratos em que o analito está em menores concentrações, como pode ser verificado pela maioria dos resultados contidos na Tabela 1.5. Entretanto, há exceções, como iprodione e paration-metil.

Tabela 1.5. Porcentagem de recuperação de agrotóxicos obtidos utilizando curva analítica preparada em solvente puro para amostras de tomate em diferentes concentrações (Adaptado da referência 9)

Agrotóxicos	Concentrações	
	< 0,02 mg kg ⁻¹	> 0,21 mg kg ⁻¹
	Porcentagem de recuperação	
Clorotanolil	253	230
Vinclozolina	150	112
Captan	245	146
Procimidone	196	150
α - Endossulfam	150	115
Bifentrina	135	82
<i>Cis</i> - permetrina	256	103
<i>Trans</i> -permetrina	206	130
Fluvalinato - I	135	113
Fluvalinato-II	238	121
Deltametrina	320	171
Iprodione	176	185
Paration	97	85
Paration-metil	97	105
Clorpirifós	111	102
Pirimicarb	114	106
Metamidofós	152	98

Alguns compostos não apresentam nenhum efeito de matriz em altas concentrações. Entretanto, podem apresentar um efeito de matriz pronunciado quando analisada menor proporção do agrotóxico na matriz, como foi observado, por exemplo, na análise de terbufós e pirazofós em frutas e vegetais.⁴¹

Esses são os principais fatores que contribuem para o efeito de matriz em análises de agrotóxicos por cromatografia em fase gasosa.

1.4. MÉTODOS PARA MINIMIZAR O EFEITO DE MATRIZ

A quantificação exata de resíduos de agrotóxicos em amostras ambientais é importante, sendo necessário o desenvolvimento de métodos para contornar o problema da alta recuperação de determinados agrotóxicos. Embora já existam na literatura vários métodos, nenhum deles pode ser considerado universal, ou seja, não é capaz de eliminar totalmente o efeito de matriz na quantificação de qualquer agrotóxico nos diversos tipos de matrizes. A escolha do método adequado para minimizar os erros depende do conjunto de agrotóxicos que se deseja analisar, do método analítico, das condições do equipamento, da disponibilidade de tempo e de recursos, etc. As propostas a seguir são as mais comuns de serem encontradas em trabalhos científicos e em laboratórios oficiais para monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

1.4.1. Curva analítica da matriz

Uma estratégia aparentemente adequada para contornar o problema criado pela presença dos sítios ativos no injetor é o mascaramento intencional desses sítios (grupos silanóis livres, metais, etc.). Nesta técnica, as soluções-padrão são preparadas em extratos da matriz, livres de resíduos de agrotóxicos (branco) e analisadas por CG. Dessa forma, os próprios componentes da matriz ocupam os sítios ativos durante a análise do padrão, assim como ocorre nas análises dos extratos.^{9,45} Essa é uma metodologia muito utilizada nas análises interlaboratoriais de agrotóxicos, a fim de minimizar a diferença entre os resultados associada ao efeito de matriz. Na Tabela 1.6 é possível observar essa diferença na quantificação de agrotóxicos por CG-EM, quando se utiliza solução-padrão preparada em solvente puro e solução-padrão preparada em extratos de amostras de batata. Para a maioria dos agrotóxicos, foram obtidas porcentagens de extração superiores a 100,0% quando a curva analítica preparada com solvente puro foi utilizada para quantificação.

Tabela 1.6. Quantificação de agrotóxicos em batata por CG-EM, utilizando solução-padrão dos agrotóxicos preparada em solvente puro e em extratos de batata (branco) (Adaptado da referência 25)

Agrotóxicos	Porcentagem de recuperação	
	(%)	
	Curva Analítica	
	Solvente puro	Extrato de batata
Mevinfós	161	88
Clorprofam	145	97
Diazinon	90	91
Dissulfoton	81	85
Dimetoato	239	94
Vinclozolin	110	86
Clorpirifós	145	90
Carbaril	277	81
Malation	169	85
Captan	207	38
Iprodione	230	94

Para análise de rotina de agrotóxicos em diferentes matrizes, o preparo dos padrões nos próprios extratos requer muito tempo. Para tais análises, seria mais viável utilizar uma matriz representativa de diversos tipos. Hill & Reynolds (1999)⁴⁶ sugeriram que essa amostra deveria ser selecionada baseando-se em sua composição (teor de água, açúcar, conteúdos ácidos, lipídios, etc.). Já Vidal et al.⁴⁷ relatam que a matriz de referência deveria ser escolhida comparando-se as inclinações das curvas analíticas, obtidas a partir de soluções-padrão de agrotóxicos preparadas em diversas matrizes. Por exemplo, amostras de pepino poderiam ser usadas como amostra de referência para vegetais, como o próprio pepino, a pimenta, a abóbora e a berinjela; a melancia como referência para frutas como a própria melancia e o melão. Outro critério proposto seria selecionar amostras de referências baseado em sua composição: cenoura representando os alimentos que são

raízes; morango representando as amostras com alto teor de açúcar; alface representando matriz com alto teor de clorofila, etc.⁴⁸

Essas estratégias, entretanto, não são recomendadas para as metodologias oficiais de análises de resíduos de agrotóxicos, por apresentarem algumas limitações, como:

- 1) estabilidade limitada de alguns agrotóxicos quando estocados por longo tempo na presença dos componentes da matriz,⁴⁹ bem como a estabilidade dos próprios componentes da matriz;
- 2) dificuldade de obter amostras da matriz com composições semelhantes;⁵⁰
- 3) aumento da demanda para manutenção da instrumentação, devido à excessiva contaminação do CG;
- 4) aumento do custo das análises.

1.4.2. Formas de injeção

Vários fatores podem estar envolvidos no aumento da resposta induzido pela matriz, mas observa-se que o principal responsável é o insertor. A ação do insertor depende da temperatura de injeção, da vazão e da pressão do gás de arraste, do volume de injeção, do tipo de solvente, do diâmetro da coluna e do tempo de retenção, pois todos esses fatores influenciam na interação do analito com a superfície.⁵¹

Baseado nisso, Vogt et al., em 1979, propuseram uma nova técnica para a introdução da amostra no CG, denominada de temperatura programada de vaporização (TPV).^{52,53} Nessa técnica, um grande volume de amostra é introduzido no injetor em temperatura apropriada à vaporização apenas do solvente, para formar depósitos de agrotóxicos e componentes da matriz no compartimento de injeção. Posteriormente, este compartimento é aquecido em temperatura e velocidade apropriada para vaporizar e transferir os compostos para a coluna cromatográfica.^{54,55}

O compartimento de injeção empregado na TPV é menor que o compartimento de injeção clássico no modo sem divisor de fluxo, sendo mais facilmente aquecido ou resfriado, diminuindo o estresse térmico para os analitos lábeis. Da mesma forma, permite maior velocidade do gás de arraste, reduzindo o tempo de permanência dos compostos no insertor aquecido. Outro benefício adicional obtido é a redução da superfície de contato dos sítios ativos do insertor com o analito.³⁸ Em geral, a substituição de técnicas de injeções

convencionais, como a injeção a quente no modo sem divisor de fluxo, pela TPV diminui o efeito de matriz, mas não o elimina para todos os compostos.⁵⁶

Outra tentativa para minimizar o efeito de matriz foi o desenvolvimento de um controle de pressão eletrônico no injetor em 1990.⁵⁷ Nessa técnica, a amostra é vaporizada com uma alta vazão de gás de arraste para a coluna, para onde é carregada rapidamente, apresentando menor tempo de residência no insertor. Conseqüentemente, ocorre uma eficiente supressão da adsorção ou degradação do analito. Depois da injeção, a vazão de gás para a coluna é ajustada automaticamente para o valor otimizado, para assegurar a separação dos componentes na coluna. Essa técnica minimiza o efeito de matriz, mas ainda não o elimina definitivamente.^{58, 59}

Perdas de analitos no sistema de injeção também podem ser evitadas utilizando-se a injeção direta na coluna (*on-column*). Erney et al.²⁴ observaram que análise de agrotóxicos organofosforados em leite, utilizando injeção na cabeça da coluna, permite a entrada de maior quantidade de agrotóxico na coluna cromatográfica, quando comparada com a técnica de injeção de vaporização do agrotóxico no injetor. Embora ocorra uma transferência não discriminativa dos componentes da amostra no sistema CG, a injeção na cabeça da coluna ainda apresenta efeito de matriz, sendo atribuído à coluna cromatográfica e não à forma de injeção. Além disso, a injeção na cabeça da coluna requer maior freqüência de manutenção, sendo uma técnica impraticável para análises de rotina em matrizes complexas.⁵¹ Zrostlíková et al.³⁸ verificaram que após cerca de 30 injeções de extratos de trigo na cabeça da coluna, os picos atribuídos a compostos polares como o carbaril, acefato, metamidofós, etc., preparados em solvente puro, eram distorcidos ou desapareciam.

Estudos envolvendo outros modos de introdução da amostra na coluna capilar são encontrados na literatura. Esses estudos visam encontrar a forma de injeção que apresente menor interferência dos componentes da matriz nas análises.^{20, 60-62}

1.4.3. Analitos protetores

A primeira tentativa de mascarar os sítios ativos do insertor, com o objetivo de minimizar a adsorção dos analitos de interesse, foi proposta por Erney et al.²⁴ Esses pesquisadores propuseram a saturação de todo o sistema

cromatográfico com o extrato da matriz, para que os compostos fossem adsorvidos na interface do insertor. Assim, ao se realizarem as análises dos padrões e extratos, estas não seriam afetadas pelo efeito de matriz. Entretanto, observaram que a saturação não era permanente, pois as áreas correspondentes aos padrões de agrotóxicos variavam, gerando um grande acúmulo de material não volátil no sistema cromatográfico.²⁴ Neste mesmo ano, Erney & Poole⁶³ propuseram a adição de compostos nas soluções-padrão que apresentassem fortes interações com o sistema cromatográfico, para diminuir a adsorção ou a degradação dos agrotóxicos. Entretanto, os compostos selecionados não proporcionaram resultados satisfatórios.⁶³

Em 2003, o uso de analitos protetores foi reintroduzido. Desta vez, foram utilizados compostos ou misturas que imitavam o comportamento dos componentes da matriz. Soluções-padrão de agrotóxicos foram preparadas em solvente puro, adicionando-se baixa concentração de aditivos (analitos protetores) capazes de interagir fortemente com a interface, como através de ligações de hidrogênio com os grupos silanóis do insertor. Esses analitos protetores devem ter volatilidade similar à dos agrotóxicos, impedindo a adsorção destes durante a análise da solução-padrão assim como ocorre nos extratos.⁵¹ Uma substância é considerada um bom analito protetor se a sua eficiência for independente da natureza da matriz, for solúvel no solvente da solução-padrão, não reagir com os agrotóxicos de interesse, não se acumular no sistema cromatográfico e não apresentar o mesmo tempo de retenção dos analitos. Esses compostos devem apresentar grupos polares, como hidroxilas, carboxilas, grupos nitrogenados, etc., para que, ao competirem com os agrotóxicos, sejam preferencialmente adsorvidos no insertor, liberando o analito para a coluna cromatográfica. Baseado nessas informações, Anastassiades et al.⁵¹ avaliaram 93 compostos como analitos protetores para análise de 30 agrotóxicos. Os analitos protetores selecionados eram açúcares e seus derivados (poliidroxilados), ácidos carboxílicos, aminoácidos, compostos alifáticos como o dodecano, compostos básicos como a uréia, etc.⁵¹

Os ácidos graxos de cadeias longas, presentes em azeite de oliva, também são bons exemplos de analitos protetores. Esses compostos são eficientes na análise de piretroides, pois ambos apresentam faixas de volatilização semelhantes e elevadas massas molares. Este analito protetor é adsorvido preferencialmente no insertor e somente se volatiliza após análise do

piretroide. Por exemplo, na análise de fluvalinato em mel, quando se utiliza azeite de oliva (contém ácido graxo) como analito protetor, é obtida uma taxa de recuperação de 100,3% para o agrotóxico. Entretanto, quando se utiliza um analito protetor ineficiente, como *L*-glucono- δ -lactona, obtém-se uma recuperação de 521,1%.¹⁰ Este mesmo composto ainda pode ser utilizado como protetor para vários outros agrotóxicos. O *L*-glucono- δ -lactona e também o sorbitol se degradam no injetor, formando vários compostos com temperatura de volatilização distinta, com vários tempos de retenção na análise cromatográfica. Já para agrotóxicos voláteis, é conveniente utilizar analitos como o 3-etoxipropano-1,2-diol como protetor.⁶⁴

Para uma análise de multirresíduos de agrotóxicos, com diferentes temperaturas de volatilização, pode ser utilizada uma mistura de agentes protetores, como a mistura dos três compostos citados anteriormente (*L*-glucono- δ -lactona, sorbitol e 3-etoxipropano-1,2-diol),^{64, 65} ou ainda açúcares, como glicose, frutose e xilose.^{51, 66}

A principal limitação desta técnica é que os melhores analitos protetores são muito polares, sendo necessária a utilização de solventes, como acetonitrila ou água, para preparar as soluções-padrão, o que limita sua utilização para análises de agrotóxicos apolares por cromatografia em fase gasosa.

1.4.4. Limpeza dos extratos

Após a extração de agrotóxicos da amostra, uma etapa adicional pode ser realizada para separar satisfatoriamente os analitos de coextrativos remanescentes, denominado limpeza dos extratos. Comumente, são empregados procedimentos como cromatografia de permeação em gel,⁶⁷ cromatografia por adsorção,^{8, 68} cartuchos de extração em fase sólida empregando vários tipos de adsorventes (sílica, C-18, carvão ativado, alumina, florisil, C-8, etc.),^{9,69-72} dispersão da matriz em fase sólida (DMFS)^{73, 74} e, mais recentemente, a extração com partição em baixa temperatura.^{33,75-77} As duas últimas técnicas consideram a extração e a limpeza realizadas simultaneamente.

Embora o processo de limpeza dos extratos possa resultar em perda de alguns compostos, bem como aumentar o tempo e o custo das análises, esta

etapa representa a alternativa mais recomendada para reduzir o efeito de matriz, por causar menos danos ao sistema cromatográfico.⁷

Schenck e Lehotay⁴¹ observaram que a utilização de carvão ativado na etapa de limpeza resultou na total remoção de pigmentos de extratos de frutas e vegetais. Entretanto, os resultados mostraram que os pigmentos não eram os principais responsáveis pelo efeito de matriz. Ao combinar carvão ativado com cartuchos de extração em fase sólida (adsorventes trocadores de íons e com grupos aminos), além da eliminação dos pigmentos, havia também redução significativa do efeito de matriz (Tabela 1.7).

Tabela 1.7. Aumento da resposta cromatográfica (solução-padrão preparada em extratos da matriz/solução-padrão preparada em solvente x100) na recuperação de agrotóxicos, usando CG-DFC na análise de extratos de maçã, com o uso do método oficial de extração, seguido por limpeza com EFS para agrotóxicos (0,070 – 0,600 mg kg⁻¹) (Adaptado da referência 41)

Agrotóxicos	Recuperação média (%)		
	Nenhuma limpeza	Carvão ativado	Adsorventes combinados*
Ometoato	145	141	108
Monocrotofós	143	145	108
Malaoxon	132	126	100
Dimetoato	130	126	107
Fosmete	129	120	92
Acefato	122	125	104

* Combinação de adsorventes: carvão ativado + trocador de ânion forte + adsorvente com grupamento amino.

A dificuldade de realizar limpeza adequada dos extratos pode ser observada pelos resultados encontrados por Pinho.⁷⁷ Na análise de agrotóxicos empregando a extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT), verificou-se que a limpeza com carvão ativado, além de remover os interferentes em análises de extratos de amostras de tomate (confirmados por

espectrofotometria), também diminui a porcentagem de extração dos agrotóxicos na análise por CG-DCE (Figuras 1.4 e 1.5).⁷⁷

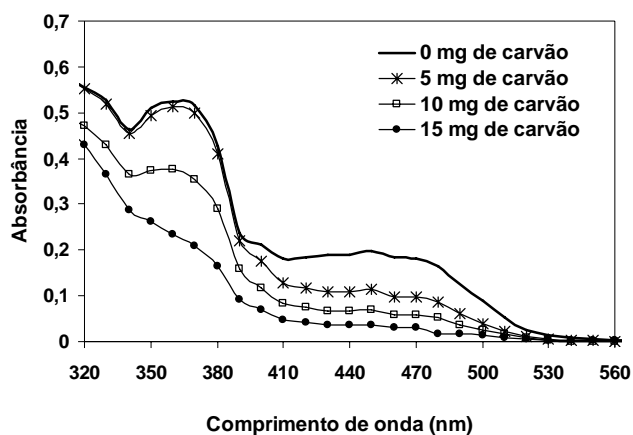


Figura 1.4. Espectros de absorção dos extratos obtidos a partir da ESL-PBT de amostras de tomate isentas de agrotóxicos (branco) com a adição de 0, 5, 10, 15 mg de carvão ativado.⁷⁷

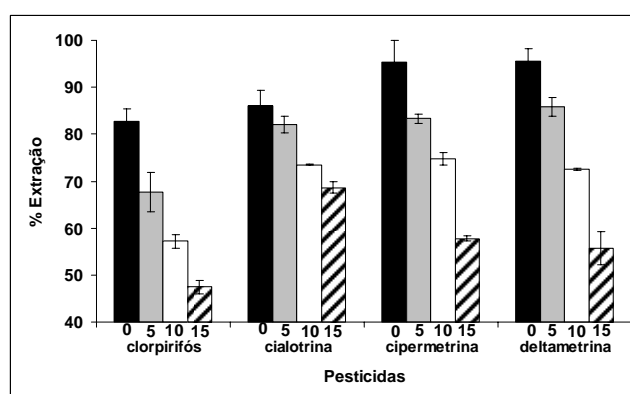


Figura 1.5. Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos clorpirifós, cipermetrina, λ -cialotrina e deltametrina com a adição de 0, 5, 10 e 15 mg de carvão ativado durante o processo de extração empregando a técnica ESL-PBT.⁷⁷

1.4.5. Função de correção

A porcentagem de extração dos analitos pode ser determinada com maior exatidão, fazendo-se uma correção nos resultados obtidos após análise cromatográfica. Este procedimento significa desconsiderar o aumento da resposta devido ao efeito de matriz. Para isso, duas curvas analíticas dos padrões de analitos são preparadas, sendo uma em solvente puro e a outra no extrato da matriz, em determinada faixa de concentração. Essas soluções são

analisadas várias vezes por determinado período, para verificar a repetibilidade e linearidade dos sinais cromatográficos.⁴² A partir das diferenças entre os parâmetros da regressão (coeficientes angular e linear) de ambas as curvas, uma função de correção é determinada e validada por tratamento estatístico.

A função de correção permite converter a concentração do analito na amostra, obtida a partir da curva analítica preparada em solvente puro, de forma a refletir o valor equivalente como se estivesse utilizando a curva de analítica preparada no extrato da matriz.⁷⁸⁻⁸¹

Na Figura 1.6 (A, B e C) estão apresentadas as curvas analíticas de análises cromatográficas de deltametrina em tomate⁷⁷ e thiametoxan em solo e batata⁸². Em cada gráfico, são apresentadas as curvas analíticas dos agrotóxicos em solventes puros e em extratos das matrizes.

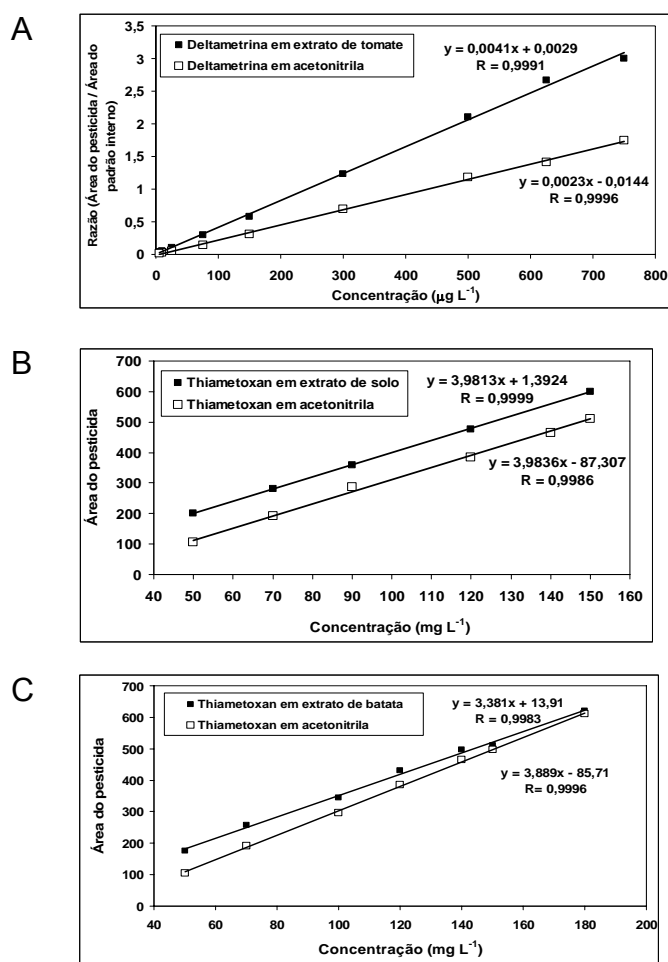


Figura 1.6. (A) Curvas analíticas preparadas em acetonitrila e em extratos de tomate para a deltametrina⁷⁷ (B) Curvas analíticas preparadas em acetonitrila e em extratos de solo para o thiametoxan⁸² (C) Curvas analíticas preparadas em acetonitrila e em extratos de batata para o thiametoxan.⁸²

A equação obtida por linearização dos dados, para as soluções-padrão preparadas em solvente puro, pode ser expressa como $Y = a_{ps}X_{ps} + b_{ps}$ (ps = padrão em solvente puro). A equação $Y = a_{pm}X_{pm} + b_{pm}$ (pm = padrão em extratos da matriz) é obtida a partir da curva analítica preparada em extrato da matriz.⁴² A relação entre as duas equações ($X_{pm} = AX_{ps} + B$) pode ser obtida igualando-as. Esta função de correção permite estimar a concentração exata do agrotóxico, após extração e análise cromatográfica, utilizando a equação em que as soluções-padrão foram preparadas em solvente puro. A constante B da função de correção representa a relação entre os coeficientes $(b_{ps} - b_{pm})/a_{pm}$ e a constante A representa a razão entre os coeficientes angulares originais a_{ps}/a_{pm} .⁷⁹

Quando apenas o coeficiente angular (a) nas duas curvas analíticas para o mesmo agrotóxico é diferente, significa que os componentes da matriz introduzem um erro sistemático proporcional e a função de correção pode ser expressa como $X_{pm} = AX_{ps}$ (Figura 1.6A). Quando apenas o coeficiente linear (b) difere, quando se comparam as duas curvas, significa que houve um erro sistemático constante, e a função de correção pode ser expressa como $X_{pm} = X_{ps} + B$ (Figura 1.6B). Ambos os erros podem ocorrer também quando os dois coeficientes são distintos para as duas curvas ($X_{pm} = AX_{ps} + B$) (Figura 1.6C).⁸⁰

83

A relação entre essas curvas analíticas pode ser usada continuamente caso não haja mudança estatisticamente significativa nos coeficientes angulares e lineares. A principal vantagem deste método é a redução do custo da análise e do tempo necessário para preparar a curva analítica no extrato da matriz de cada análise, além de diminuir a frequência de manutenção do CG devido à menor introdução dos componentes da matriz no aparelho.

A aplicação da função de correção, entretanto, limita-se à quantificação de agrotóxicos, variando somente numa estreita faixa de concentração, pois a extensão do efeito de matriz depende da razão das concentrações do analito e componentes da matriz.^{79,80} Além disso, a função de correção é dependente da estabilidade do agrotóxico em todo o procedimento analítico, por exemplo, o uso de um sistema CG diferente já conduz a resultados variados.

1.4.6. Método de adição de padrão

Esta ferramenta também pode ser utilizada para corrigir a influência dos componentes da matriz na quantificação exata de agrotóxico numa amostra individual. A amostra contendo o agrotóxico de interesse é submetida a um processo de extração, e o extrato obtido é dividido em uma série de subamostras. Quantidades diferentes e conhecidas de padrões do agrotóxico são adicionadas em cada subamostra, que são aferidas para o mesmo volume, e analisadas nas mesmas condições cromatográficas. A concentração do agrotóxico é determinada por regressão linear.²⁵

As desvantagens deste método é que, para cada amostra, é necessário construir uma curva analítica. Logo, restringe-se a análise a pequeno número de amostras. Além disso, pode conduzir a resultados errôneos, porque considera que o efeito de matriz é independente da concentração do analito. Esta técnica proporciona maior contaminação do sistema cromatográfico, necessitando de manutenção com maior freqüência, por isso observa-se na literatura a escassez de trabalhos utilizando-a.

1.5. CONCLUSÃO

Em termos gerais, a exatidão e precisão dos resultados das análises de traços de agrotóxicos por cromatografia em fase gasosa são afetadas pelo efeito de matriz; principalmente, quando se utilizam soluções-padrão de agrotóxicos preparadas em solvente puro para a quantificação destes em matrizes de natureza complexa. É necessário conhecer as propriedades dos agrotóxicos analisados (volatilidade, estabilidade térmica, polaridade, etc.), bem como os principais componentes da matriz, para propor uma metodologia de prevenção (limpeza, injeção na cabeça da coluna, PTV, etc.) ou mesmo compensação da ocorrência de efeito de matriz (analitos protetores, função de correção, adição de padrão, etc.). Entre os diversos métodos propostos para minimizar o efeito de matriz, o mais comum é o uso de soluções-padrão preparadas no próprio extrato da matriz, enquanto o uso de analitos protetores tem se mostrado muito promissor nesta área.

1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Coutinho, C. F. B.; Tanimoto, S. T.; Galli, A.; Garbellini, G. S.; Takayama, M.; Amaral, R. B.; Mazo, L. H.; Avaca, L. A.; Machado, S. A. S.; *Agrotóxicos: r. ecotox. e meio ambiente* **2005**, *15*, 65.
2. Cooper, J.; Dobson, H.; *Crop Prot.* **2007**, *26*, 1337.
3. http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/rel_anual_2001-2006.pdf, acessada em dezembro de 2007.
4. Beyer, A.; Biziuk, M.; *Food Chem.* **2007**, *108*, 2008.
5. Van der Hoff, G. R.; Van Zoonen, P.; *J. Chromatogr. A.* **1999**, *843*, 301.
6. Motohashi, N.; Nagashima, H.; Parkanyi, C.; Subrahmanyam, B.; Zhang, G.; *J. Chromatogr., A* **1996**, *754*, 333.
7. Hajslová, J.; Holadova, K.; Kocourek, V.; Poustka, J.; Godula, M.; Cuhra, P.; Kempny, M.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *800*, 283.
8. Jimenez, J. J.; Bernal, J. L.; Nozal, M. J.; Toribio, L.; Martín, M. T.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *823*, 381.
9. Menkissoglu-Spiroudi, U.; Fotopoulou, A.; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2004**, *84*, 15.
10. Sanchez-Brunete, C.; Albero, B.; Martín. G.; Tadeo, J. L.; *Anal.Sci.* **2005**, *21*, 129.
11. Shimelis, O.; Yang, Y.; Stenerson, K.; Kaneko, T.; Ye, M.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1165*, 18.
12. Rodrigues, M. V. N.; Reyes, F. G. R.; Magalhães, P. M.; Rath, S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 135.
13. Gonzalez-Rodriguez, R. M.; Rial-Otero, R.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gandara, J.; *Food Chem.* **2008**, *107*, 1342.
14. Salvador, M.; Frenich, A. G.; González, F. J. E.; J. L.; Vidal, M.; *Chromatographia* **2006**, *64*, 667.
15. Hajslová, J.; Zrostlikova, J.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1000*, 181.
16. Montigny, C.; Lespes, G.; Potin-Gautier, M.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *819*, 221.
17. Carson, L. J.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1981**, *64*, 714
18. Stan, H. J.; Goebel, H.; *J. Chromatogr., A* **1983**, *268*, 55.
19. Stan, H. J.; Goebel, H.; *J. Chromatogr., A* **1984**, *314*, 413.
20. Stan, H. J.; Muller, H. M.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1988**, *11*, 140.

21. Mallet, C.; Mallet, V. N.; *J. Chromatogr., A* **1989**, *481*, 37.
22. Hernandez, F. H.; Grases, J. M.; Beltran, J.; Sancho, J. V.; *Chromatographia* **1990**, *29*, 459.
23. Gillespie, A. M.; Walters, S. M.; *Anal. Chim. Acta*, **1991**, *245*, 259.
24. Erney, D. R.; Gillespie, A. M.; Gilvydis, D. M.; *J. Chromatogr., A* **1993**, *638*, 57.
25. Lehotay, S. J.; Eller, K. I.; *J. AOAC Int.* **1995**, *78*, 821.
26. Yamazaki, Y.; Ninomiya, T.; *J. AOAC Int.* **1996**, *79*, 787.
27. Albero, B.; Sanchez-Brunete, C.; Tadeo, J. L.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5828.
28. Albero, B.; Sanchez-Brunete, C.; Tadeo, J. L.; *Talanta* **2005**, *66*, 917.
29. Holland, P. T.; McNaughton, D. E.; Malcolm, C. P.; *J. AOAC Int.* **1994**, *77*, 79.
30. Bernal, J. L.; Del Nozal, M. J.; Jimenez, J. J.; Rivera, J. M.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *778*, 111.
31. Cabras, P.; Anglont, A.; Mehs, M.; Minelli, E. V.; Pirisi, F. M.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *761*, 327.
32. Molinari, G. P.; Cavanna, S.; Fornara, L.; *Food Addit. Contam.* **1998**, *15*, 661.
33. Lentza-Rizos, C.; Avramides, E. J.; Cherasco, F.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *912*, 135.
34. Frenich, A. G.; Bolaños, P. P.; Vidal, J. L. M.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1153*, 194.
35. Thomsen, C.; Leknes, H.; Lundanes, E.; Becher, G.; *J. Anal. Toxicol.* **2002**, *26*, 129.
36. Sanchez-Brunete, C.; Albero, B.; Tadeo, J. L.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1445.
37. Saari, E.; Perämäki, P.; Jalonen, J.; *Microchem. J.* **2007**, *87*, 113.
38. Zrostlíková, J.; Hajslova, J.; Godula, M.; Mastovska, E.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *937*, 73.
39. Domotorova, M.; Kirchner, M.; Matisova, E.; Zeeuw, J.; *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 1051.
40. Poole, C. F.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1158*, 241.
41. Schenck, F. J.; Lehotay, S. J.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *868*, 51.

42. Torres, M. E. H.; Gonzalez, F. J. E.; Cuadros-Rodríguez, L.; Lopez, E. A.; Vidal, J. L. M.; *Chromatographia* **2003**, *57*, 657.
43. Grob, K.; Grob, G.; *J. Chromatogr., A* **1981**, *219*, 13.
44. Klotz, W. L.; Schure, M. R.; Foley, J. P.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *930*, 145.
45. Erney, D. R.; Pawlowski, T. M.; Poole, C. F.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1997**, *20*, 375.
46. Hill, A. R. C.; Reynolds, S. L.; *Analyst* **1999**, *124*, 953.
47. Vidal, J. L. M.; Arrebola, F. J.; Garrido-Frenich, A.; Martinez Fernandez, J.; Mateu-Sanchez, M.; *Chromatographia* **2004**, *59*, 321.
48. Mercer, G. E.; *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 1452
49. Kocourek, V.; Hajslova, J.; Holadová, K.; Poustka, J.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *800*, 297.
50. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
51. Anastassiades, M.; Mastovská, K.; Lehotay, S. J.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1015*, 163.
52. Vogt, W.; Jacob, K.; Ohnesorge, A. B.; Obwexer, H. W.; *J. Chromatogr., A* **1979**, *186*, 197.
53. Vogt, W.; Jacob, K.; Obwexer, H. W.; *J. Chromatogr., A* **1979**, *174*, 437.
54. Pereira, A. S.; Neto, F. R. A.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 370.
55. Godula, M.; Hajslová, J.; Mastouska, K.; Krivanková, J.; *J. Sep. Sci.* **2001**, *24*, 355.
56. Rantakokko, P.; Yritys, M.; Vartiainen, T.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1028*, 179.
57. Wylie, P. L.; Uchiyama, K.; *J. AOAC Int.* **1996**, *79*, 571.
58. Wylie, P. L.; Klein, K. J.; Thompson, M. Q.; Hermann, B. W.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1992**, *15*, 763.
59. Godula, M.; Hajslová, J.; Alterová, K.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1999**, *22*, 395.
60. Grob Jr, K.; *J. Chromatogr., A* **1985**, *324*, 251.
61. Muller, H. M.; Stan, H. J.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1990**, *13*, 759.
62. Lehotay, S. J.; *J. AOAC Int.* **2000**, *83*, 680.
63. Erney, D. R.; Poole, C. F.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1993**, *16*, 501.
64. Kirchner, M.; Huskova, R.; Matisova, E.; Mocak, J.; *J. Chromatogr., A* **2007**
(no prelo)

65. Mastovska, K.; Lehotay, S. J.; Anastassiades, M.; *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 8129.
66. LePage, J. T.; Hebert, V. R.; Tomaszewska, E. M.; Rothlein, J. E.; McCauley, L.; *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 1788.
67. Johnson, P. D.; Duncan, A. R.; Brown, R. H.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *765*, 135.
68. Kumar, A.; Nadda, G.; Shanker, A.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1050*, 193.
69. Hennion, M.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *885*, 73.
70. Quintana, J.; Martí, I.; Ventura, F.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *938*, 3.
71. Jimenez, J.; Bernal, J.; Del Nozal, M.; Toribio, L.; Arias, E.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *919*, 147.
72. Podhorniak, L. V.; Negron, J. F.; Griffith Jr., F. D.; *J. AOAC Int.* **2001**, *84*, 873.
73. Barker, S. A.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *880*, 63
74. Barker, S. A.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *885*, 115.
75. Goulart, S. M.; Queiroz, M. E. L. R., Neves, A. A.; Queiroz, J. H.; *Talanta* **2008**, *75*, 1320.
76. Vieira, H. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 535.
77. Pinho, G. P.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2007.
78. González, F. J. E.; Torres, M. E. H.; Cuadros-Rodriguez, L. C.; Lopez, E. A.; Martinez Vidal, J. L.; *Analyst* **2002**, *127*, 1038.
79. González, F. J. E.; Torres, M. E. H.; López, E. A.; Cuadros-Rodriguez, L.; Vidal, J. L. M.; *J. Chromatogr., A* **2002**, *996*, 155.
80. Cuadros-Rodriguez, L.; García-Campana, A. M.; Almansa-López, E.; Egea-González, F. J.; Cano, M. L. C.; Frenich, A. G.; Marínez-Vidal, J. L.; *Anal. Chim. Acta* **2003**, *478*, 281.
81. Martínez-Galera, M.; Lopez-Lopez, T.; Gil-Garcia, M. D.; Martínez Vidal, J. L.; Picon-Zamora, D.; Cuadros-Rodriguez, L.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375*, 653.
82. Bittencourt, L. M.; Coelho, J. M.; Mattos, L. V.; Queiroz, M. E. L. R.; Neves, A. A.; *Resumos do 21º Encontro Regional da SBQ*, Uberlândia, Brasil, 2007.
83. Cuadros-Rodriguez, L.; Gaemiz-Gracia, L.; Almansa-Loópez, E. M.; Bosque-Sendra, J. M.; *Trends Anal. Chem.* **2001**, *20*, 620.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DOS COMPONENTES DO TOMATE NA ADSORÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

2.1. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são largamente utilizados na agricultura para minimizar as perdas na produtividade atribuídas ao ataque de pragas.¹ Entretanto, seu uso excessivo pode gerar resíduos no solo, na água e nos alimentos.^{2,3} As agências reguladoras governamentais têm estabelecido o limite máximo de resíduo (LMR) de agrotóxicos que podem ser encontrado em alimentos.^{4,5} Para monitorar e controlar esse limite, métodos analíticos com maior precisão e exatidão são necessários. Em geral, a cromatografia em fase gasosa tem-se destacado pela sua capacidade de analisar uma diversidade de compostos em níveis de traços (ppb) e ultratraços (ppt).⁶ Entretanto, durante as análises de resíduos de agrotóxicos em extratos de matrizes complexas, os componentes endógenos destas podem interferir na quantificação dos agrotóxicos, gerando erros como “falso positivo” (impurezas são eluídas com mesmo tempo de

retenção dos agrotóxicos), “falso negativo” (quando há perdas do agrotóxico no sistema de injeção) ou ainda resultados superestimados.⁷⁻⁹

A superestimação dos resultados é observada quando rendimentos de extração superiores a 100,0% são obtidos. Isso ocorre, principalmente, quando soluções-padrão de agrotóxicos preparadas em solvente puro são empregadas na quantificação, e nessa condição, os analitos podem ser degradados e/ou adsorvidos no sistema cromatográfico. Nas análises dos extratos de matrizes complexas ocorre uma competição entre os agrotóxicos e os componentes da matriz por sítios de adsorção do sistema cromatográfico. A adsorção preferencial dos componentes da matriz pode impedir degradações ou facilitar a transferência dos agrotóxicos do injetor para a coluna.¹⁰⁻¹⁷

Dentre as diversas matrizes analisadas em nosso laboratório, extratos orgânicos de amostras de tomate, obtidos pela extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT), têm-se destacado por apresentarem elevado aumento da resposta cromatográfica de agrotóxicos. Componentes dessa matriz têm revelado alto potencial de efeito protetor de analitos durante as análises. Mesmo após etapas de limpeza dos extratos orgânicos de tomate (cromatografia de permeação em gel, extração líquido-líquido, dispersão da matriz em fase sólida, etc.) ainda há coextrativos remanescentes, como pigmentos e compostos fenólicos antioxidantes, devido à miscibilidade destes compostos no solvente extrator.¹⁸⁻²¹

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de coextrativos de amostras de tomate na resposta cromatográfica de quatro agrotóxicos, frequentemente detectados em estudos de monitoramento de resíduos em tomates. Saturação do CG-ECD com os coextrativos, curva de analítica em solvente e curva analítica em extratos da matriz foram utilizados para avaliar o efeito de matriz. A presença dos coextrativos em extratos orgânicos foi confirmada por análises espectrofotométricas.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Reagentes

Soluções-padrão estoque de clorpirifós (99,0% m/m), cipermetrina (92,4% m/m) e deltametrina (99,0% m/m), obtidos da Chem Service (West Chester, PA, USA), e λ -cialotrina (86,5% m/m), obtida da Syngenta, foram

preparadas em acetonitrila na concentração de 500,0 mg L⁻¹, e armazenadas em temperatura de 4 °C. A partir da diluição das soluções estoque, foi preparada a solução de trabalho contendo os quatro agrotóxicos em concentrações de 50,0 mg L⁻¹ no mesmo solvente. O mesmo procedimento foi empregado para o preparo da solução de bifentrina (92,2% m/m) da FMC (Brasil) em concentração de 50,0 mg L⁻¹, utilizada como padrão interno.

Como solventes foram utilizados o acetato de etila para análises de traços da Merck (Darmstadt, Alemanha) e acetonitrila da Mallinckrodt/HPLC (Paris, França). Sulfato de sódio anidro com grau de pureza superior a 99,0% foi adquirido na Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

2.2.2. Equipamentos e condições de análises

2.2.2.1. Equipamentos de laboratório

Um banho ultrassônico da Unique (São Paulo, Brasil) foi utilizado durante o preparo das amostras. O gerador deste banho tem saída de 150 W e frequência de 25 kHz. Também foi utilizado um espectrofotômetro UV-Visível U-1100 (Hitachi).

2.2.2.2. CG-DCE

Foi utilizado um cromatógrafo a gás da Shimadzu (GC-17A) equipado com um detector por captura de elétrons (DCE) e uma coluna capilar HP-5 da Agilent Technologies, com fase estacionária composta de 5,0% fenilmetilsiloxano e 95,0% dimetilsiloxano (30 m x 0,25 mm d.i., 0,1 µm de espessura do filme), sendo o nitrogênio o gás de arraste (1,2 mL min⁻¹). Para avaliação do efeito de matriz na análise de agrotóxicos em tomates, as condições cromatográficas foram temperatura do injetor de 280 °C, e coluna inicialmente a 150 °C, aquecida a 10 °C min⁻¹ até 290 °C, permanecendo nessa temperatura por 1 minuto. A temperatura do detector foi de 300 °C. Foi injetado 1 µL de amostra no cromatógrafo a uma razão de split 1:5.

2.2.3. Procedimento analítico

2.2.3.1. Preparo do extrato orgânico de tomate por extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT)

Amostras de tomates hidropônicos, adquiridos no comércio da cidade de Viçosa – MG, Brasil, com identificação de isentos de agrotóxicos, foram

trituras em multiprocessador. Quatro gramas da polpa de tomate foram transferidos para frasco de vidro transparente (22 mL), e, em seguida, foi adicionado a mistura extratora, constituída de 6,50 mL de acetonitrila, 1,50 acetato de etila e 0,50 mL de água. O sistema foi submetido à agitação em banho ultrassônico por 10 minutos e resfriado em freezer a -20 °C por 6 horas. Após esse período, foi obtido um sistema bifásico constituído da fase sólida (formada pelo congelamento da fase aquosa e da polpa de tomate) e da fase líquida (sobrenadante). Este líquido foi passado em papel de filtro contendo 1,50 g de sulfato de sódio anidro. O volume do filtrado obtido (extrato) foi aferido em balão volumétrico de 10,00 mL com acetonitrila e armazenado no freezer até o momento da análise por CG-DCE.

2.2.3.2. Adição de carvão ativo à amostra submetida a ESL-PBT

Neste estudo, 0, 5, 10 e 15 mg de carvão ativo (Carlo Erba, Milan, Itália) foram adicionados diretamente à amostra, antes da homogeneização com a fase extratora. O efeito da adição do carvão na amostra para obtenção de extratos mais puros foi avaliado pelas características dos cromatogramas (ruídos da linha de base e picos interferentes) e porcentagem de extração dos agrotóxicos. A presença dos coextrativos nos extratos orgânicos foi analisada por espectrofotometria na região do UV-Visível.

2.2.3.3. Resposta cromatográfica após saturação do sistema

Utilizando um CG-DCE equipado com coluna e insertor, devidamente limpos, foi avaliada a saturação do CG por componentes do tomate nas respostas do clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina. Solução-padrão dos agrotóxicos ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) foi injetada sucessivamente no CG-DCE (cinco repetições). Saturação do sistema cromatográfico foi obtida com cinco injeções sucessivas de extratos orgânicos de amostras de tomate livre de agrotóxicos. A resposta do detector, após a saturação do CG, foi reavaliada com cinco novas injeções sucessivas da mesma solução-padrão dos quatro agrotóxicos, em acetonitrila, na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

2.2.3.4. Curvas analíticas

Para avaliar a influência dos componentes da matriz na resposta do detector, foram também preparadas curvas analíticas utilizando o método da

padronização interna. Duas séries de soluções-padrão contendo os quatro agrotóxicos nas concentrações de 5; 20; 50; 100; 300; e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram preparadas. A primeira série foi obtida pela diluição da solução de trabalho contendo os quatro agrotóxicos a 50 mg L^{-1} em acetonitrila pura (duplicata). A segunda série dos padrões foi preparada pela diluição da mesma solução de trabalho em extrato da matriz (duplicata), obtido a partir da ESL-PBT de tomates hidropônicos isentos de agrotóxicos.

2.2.3.5. Efeito da variação da concentração da deltametrina na quantificação do clorpirifós

Uma série de soluções-padrão contendo simultaneamente clorpirifós e deltametrina foram preparadas em acetonitrila pura. A concentração do clorpirifós foi fixada em 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto a de deltametrina variou 5; 20; 50; 100; 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

2.2.3.6. Efeito das quantidades dos componentes da matriz na quantificação da deltametrina

Cinco soluções-padrão de deltametrina a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram preparadas pela diluições de solução-padrão em acetonitrila, a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Essas soluções foram preparadas acrescentando-se diferentes volumes de acetonitrila e de extratos orgânicos da ESL-PBT de amostra de tomate (A1 a A5) para se obter 5,0 mL de solução, como representado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Volumes de acetonitrila e do extrato orgânico de amostra de tomate usados na diluição de solução de deltametrina a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ na obtenção de 5,00 mL de solução a $50 \mu\text{g L}^{-1}$

	Volume em mL				
	A1	A2	A3	A4	A5
Solução- padrão deltametrina ($500 \mu\text{g L}^{-1}$)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Extrato da matriz	0,00	1,00	2,00	3,00	4,00
Acetonitrila	4,50	3,50	2,50	1,50	0,50
Total	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Adição de carvão ativo à amostra

Extratos orgânicos obtidos de amostras de tomates são ricos em pigmentos, como o licopeno e o β -caroteno. Além desses compostos, os extratos também podem conter quantidades significativas de compostos fenólicos, como os flavonoides.²⁰ A análise espectrofotométrica desses extratos orgânicos mostra uma banda de absorção na região de 340 a 390 nm, correspondendo aos compostos fenólicos, e uma banda na região do visível entre 440 e 480 nm, correspondendo à absorção dos carotenoides.¹⁹ A remoção desses compostos dos extratos orgânicos de amostra de tomate pode ser realizada pela adição de carvão ativo no processo de extração (Figura 2.1). No entanto, essa etapa não foi utilizada no método de extração, pois diminui significativamente a eficiência da extração. Dessa forma, é inevitável que componentes da matriz sejam introduzidos no sistema cromatográfico durante as análises de resíduos de agrotóxicos em extratos orgânicos de amostras de tomate.

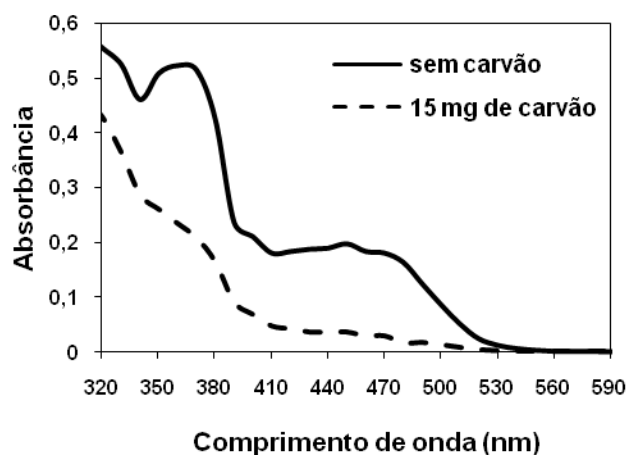


Figura 2.1. Espectros de absorção dos extratos orgânicos obtidos a partir da ESL-PBT de amostras de tomate isento de agrotóxicos, sem adição de carvão ativo e com adição de 15 mg de carvão ativo.

Os carotenoides são compostos de elevada massa molar, mas quando aquecidos em temperatura superior a 150 °C podem se degradar em compostos voláteis.²² Isso sugere que compostos fenólicos, pigmentos e produtos de degradação dos pigmentos, formados no injetor, podem entrar no sistema cromatográfico e ser responsáveis pelo efeito de matriz.

2.3.2. Resposta cromatográfica após saturação do sistema

O efeito de matriz pode ser descrito como o aumento da resposta cromatográfica de agrotóxicos causado por coextrativos, que podem saturar os sítios ativos do insertor, da coluna ou do detector. Os resultados obtidos após a saturação do sistema cromatográfico com injeções sucessivas do extrato orgânico de amostras de tomates (branco) mostram um expressivo aumento nas áreas dos padrões de agrotóxicos em acetonitrila. Na Figura 2.2 são apresentadas as porcentagens de aumento das áreas atribuídas aos agrotóxicos analisados $[\% = (\bar{A}_{\text{Depois}} - \bar{A}_{\text{Antes}}) / \bar{A}_{\text{Antes}} \times 100]$.

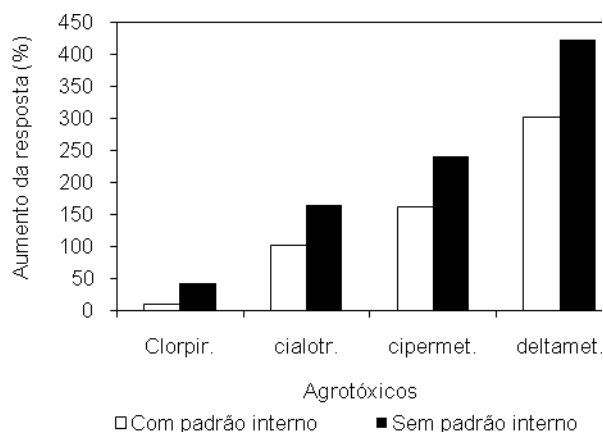


Figura 2.2. Porcentagem de aumento da resposta atribuída aos agrotóxicos ($50,0 \mu\text{g L}^{-1}$) após a saturação do sistema cromatográfico com extratos orgânicos de amostras de tomate, com e sem utilização do padrão interno nos cálculos.

A porcentagem de aumento das áreas para esses quatro agrotóxicos está associada ao tempo de retenção desses compostos (Figura 2.3), pois observa-se que quanto maior o tempo de retenção, maior é o efeito de matriz de cada composto. Vale destacar que o efeito de matriz, embora minimizado, não é eliminado pelo método da padronização interna, pois a resposta cromatográfica da deltametrina apresentou uma taxa de aumento de cerca de 300% na presença do padrão interno. Aumento nas respostas cromatográficas também foi observado para os demais agrotóxicos (clorpirifós: 10%, λ -cialotrina: 103% e cipermetrina: 162%). O padrão interno utilizado neste trabalho foi a bifentrina, que também é um piretroide, semelhante à λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina. Entretanto, verificou-se que o efeito de matriz apresentado pelo próprio padrão interno é semelhante ao organofosforado clorpirifós. Esse resultado pode ser atribuído à eluição subsequente da bifentrina na análise cromatográfica (Figura 2.3).

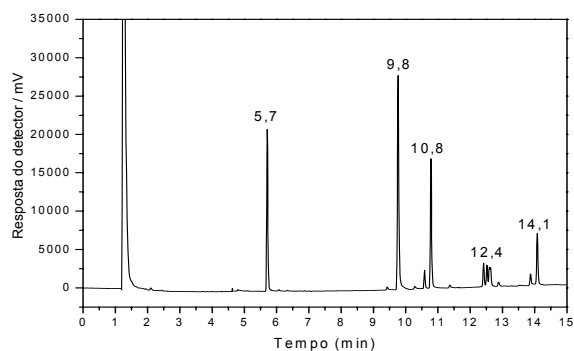


Figura 2.3. Cromatograma da solução padrão de $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ dos agrotóxicos, em que: $t_R=5,7$ min: clorpirifós, $t_R=9,8$ min: bifentrina (padrão interno), $t_R=10,8$ min: λ -cialotrina, $t_R=12,4$ min: cipermetrina e $t_R=14,1$ min: deltametrina.

2.3.3. Curvas analíticas

O efeito de matriz pode ser avaliado também pela comparação entre curvas analíticas construídas a partir de soluções de agrotóxicos preparadas em solvente puro e em extrato orgânico obtido de tomate isento de agrotóxicos (Figura 2.4).

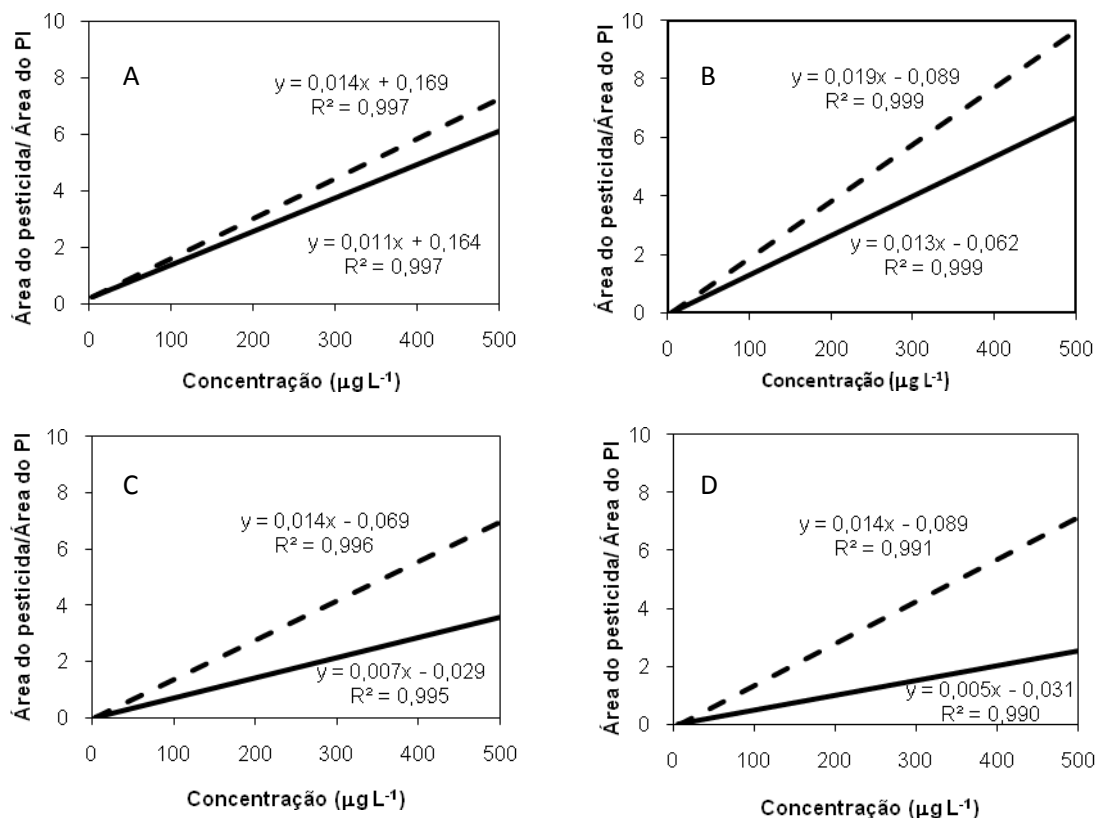


Figura 2.4. Curvas analíticas construídas a partir de soluções de agrotóxicos preparadas em acetonitrila (__) e em extrato da matriz (----): A) clorpirifós, B) λ -cialotrina, C) cipermetrina, D) deltametrina.

Os resultados apresentados na Figura 2.4 apontam para diferenças, entre os coeficientes angulares e lineares das duas curvas analíticas para cada agrotóxico, destacando-se o efeito de matriz mais acentuado para agrotóxicos com maior tempo de retenção. De acordo com os resultados anteriores, o clorpirifós foi o agrotóxico que sofreu menor mudança na resposta cromatográfica quando analisado em solvente puro e em extrato da matriz.

Comparando as duas curvas analíticas verificou-se que, quando somente o coeficiente angular varia, os componentes da matriz contribuem para introduzir nos resultados um erro sistemático proporcional.²³ Neste tipo de erro, quanto maior a concentração do agrotóxico, maior é a diferença, em termos absolutos, entre a área deste em solvente puro e em extrato de matriz, ou seja, maior é a quantidade de composto que fica adsorvida no sistema cromatográfico quando se emprega solvente puro. Outra característica do erro proporcional é que, quando se determina a porcentagem de agrotóxicos adsorvida, ela tende a ser constante na faixa de concentração avaliada.

Quando apenas o coeficiente linear varia, significa que há um erro sistemático constante.²³ Quando os componentes da matriz introduzem este tipo de erro, a diferença entre a área do agrotóxico em solvente puro e em extrato da matriz tende a assumir um valor único, independente da concentração do agrotóxico, e as curvas analíticas são paralelas. Entretanto, quando os cálculos são feitos em relação à porcentagem de aumento da resposta (área), esta será tanto maior quanto menor for a concentração dos agrotóxicos. Esta informação é coerente com os resultados encontrados por Hajslová e colaboradores (1998),⁸ que observaram que o efeito de matriz é mais significativo em análises de agrotóxicos em concentrações mais baixas. Esses erros podem ocorrer também devido a variações nos dois coeficientes.²³

Neste trabalho, para identificar o tipo de erro proporcionado pelos componentes da matriz, foi calculada a razão entre os coeficientes das curvas analíticas no extrato da matriz e em solvente puro (Tabela 2.2) Considerando somente a relação entre os coeficientes angulares (matriz/solvente), o aumento da resposta cromatográfica foi 27%; 46%; 100%; e 180% para os agrotóxicos clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, respectivamente. Já a relação entre os coeficientes lineares das curvas (matriz/solvente), o aumento foi de 3%, 42%, 138% e 187%, para os agrotóxicos, respectivamente. Dessa forma, para os quatro agrotóxicos, o efeito de matriz tem erro sistemático proporcional e também erro sistemático constante. Para concentrações mais altas, os coeficientes angulares das curvas têm maior influência e determina o aumento da resposta. Isso pode ser evidenciado pelos resultados apresentados na Figura 2.5, em que foi determinada a porcentagem de aumento da resposta cromatográfica dos agrotóxicos clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina [% = $(\bar{A}_{\text{matriz}} - \bar{A}_{\text{solvente}}) / \bar{A}_{\text{solvente}} \times 100$].

Tabela 2.2. Razão entre os coeficientes angulares e razão entre os coeficientes lineares das curvas analíticas obtidas em extratos da matriz e em solvente puro

Agrotóxicos	Razão entre os coeficientes angulares (matriz/solvente)	Razão entre os coeficientes lineares (matriz/solvente)
clorpirifós	1,27	1,03
λ -cialotrina	1,46	1,43
cipermetrina	2,00	2,38
deltametrina	2,80	2,87

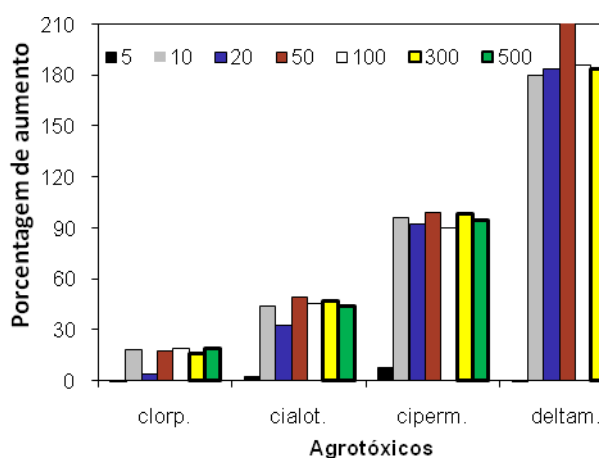


Figura 2.5. Porcentagem de aumento da resposta cromatográfica dos agrotóxicos clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina quando preparados em soluções com extratos de tomate em relação às preparadas em solvente puro nas concentrações de 5, 10, 20, 50, 100, 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

2.3.4. Efeito da variação da concentração da deltametrina na quantificação do clorpirifós

Trabalhos anteriores têm demonstrado que altas taxas de recuperação e baixa precisão dos resultados são observadas em análises de agrotóxicos contendo grupamento -P=O, enquanto que o efeito de matriz é menos significativo em agrotóxicos contendo grupamento P=S, característico de organofosforados como o clorpirifós (Figura 2.6).⁸ Já os piretroides (Figura 2.6), apesar de ser menos polares, apresentam efeito de matriz significativo. Neste

caso, a elevada massa molar dos agrotóxicos (acima de 400 g mol^{-1}) dificulta a volatilização, logo o tempo de permanência no insertor deve ser ligeiramente maior, permitindo maior adsorção e diminuindo a resposta do detector quando o agrotóxico é injetado em solvente puro.²⁴

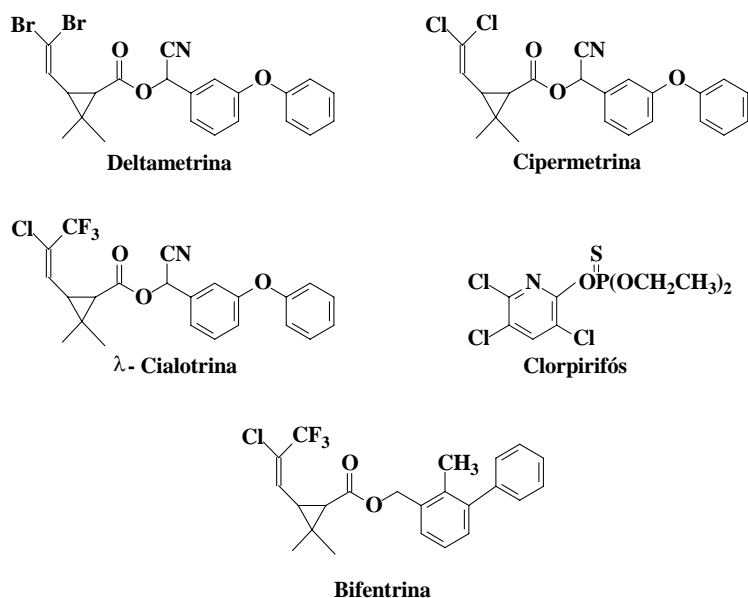


Figura 2.6. Estruturas químicas de piretroides e do organofosforado clorpirifós.

Para explicar o baixo efeito de matriz observado para o organofosforado, estudou-se, em detalhes, a possibilidade de piretroides (especificamente a deltametrina) atuarem como um analito protetor para o clorpirifós durante a análise da solução-padrão. A competição entre o clorpirifós e a deltametrina pelos sítios ativos de adsorção do CG foi avaliada fixando-se a concentração do clorpirifós e variando a concentração da deltametrina. Os resultados são apresentados na Figura 2.7.

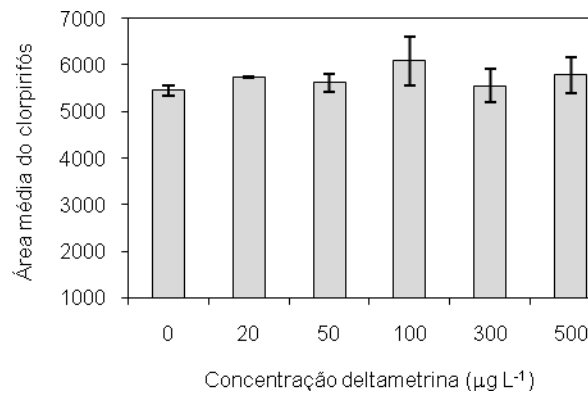


Figura 2.7. Área média do clorpirifós a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ obtido em análise cromatográfica com diferentes concentrações de deltametrina (0, 20, 50, 100, 300 e $500 \mu\text{g L}^{-1}$) para 5 mL de solução.

Os resultados observados na Figura 2.7 mostram que aparentemente a deltametrina não influencia na adsorção do clorpirifós no sistema cromatográfico, pois as áreas médias para o clorpirifós a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ são estatisticamente semelhantes, independente da concentração da deltametrina na solução-padrão.

2.3.5. Efeito da quantidade de componentes da matriz na quantificação da deltametrina

A adsorção da deltametrina foi avaliada fixando-se a concentração deste agrotóxico ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) e variando a quantidade de componentes da matriz. Esses constituintes, principalmente os carotenoides, possuem elevada massa molar, e os resultados mostram nitidamente que ocorre competição entre a deltametrina e os constituintes da matriz pelos sítios ativos no CG (Figura 2.8).

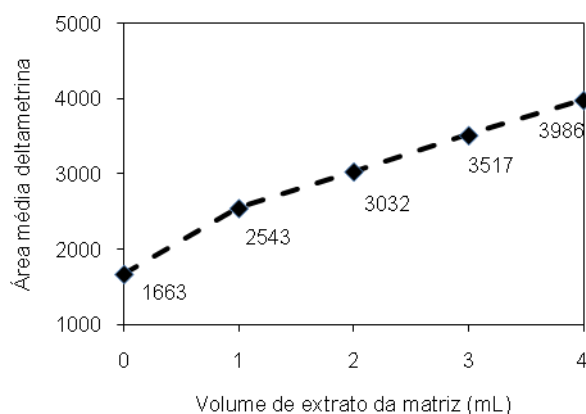


Figura 2.8. Resposta cromatográfica da deltametrina a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ variando a quantidade de componentes da matriz (0, 1, 2, 3 e 4 mL de extrato orgânico obtido de amostra de tomate) para 5 mL de solução.

A adição do primeiro volume de extrato (1 mL) contendo os componentes da matriz causa maior variação na área da deltametrina, ou seja, a competição pelos sítios é mais intensa. Já a adição de volumes maiores de extratos provoca um aumento da resposta constante. Esses experimentos não foram realizados para o clorpirifós porque os dados anteriores indicaram baixa influência dos componentes da matriz na resposta desse analito.

2.4. CONCLUSÃO

A análise de agrotóxicos em extratos orgânicos, obtidos a partir da ESL-PBT de amostras de tomate, apresentou interferência dos coextrativos. Os componentes endógenos do tomate presentes nos extratos proporcionaram aumento da resposta cromatográfica, principalmente para os piretroides (clorpirifós < λ -cialotrina < cipermetrina < deltametrina). Também foi observado que o padrão interno minimizou o efeito da matriz, mas não o eliminou, e que não houve competição entre os agrotóxicos por sítios de adsorção do sistema cromatográfico.

Os componentes da matriz introduziram um erro sistemático proporcional na faixa de concentração (5 a $500 \mu\text{g L}^{-1}$), pois a diferença entre a área do agrotóxico preparado em extrato orgânico e solvente puro foi maior com o aumento da concentração, entretanto a porcentagem de aumento da

área foi sempre constante na faixa de concentração de 5 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os agrotóxicos clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina.

Novos estudos para investigar a adsorção destes agrotóxicos no injetor e na coluna em cromatografia gasosa ainda são necessários, para explicar a relação entre o tempo de retenção e o efeito de matriz.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cooper, J.; Dobson, H.; *Crop Prot.* **2007**, *26*, 1337.
2. Cabrera, L.; Costa, F. P.; Primel, E. G.; *Quim. Nova*, **2008**, *31*, 1982.
3. Rissato, S. R.; Galhiane, M. S.; Knoll, F. R. N.; Andrade, R. M. B.; Almeida, M. V.; *Quim. Nova*, **2006**, *29*, 950.
4. <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>, acessada em novembro de 2008.
5. <http://www.codexalimentarius.net/mrls>, acessada em novembro de 2008.
6. Van der Hoff, G. R.; Van Zoonen, P.; *J. Chromatogr. A*. **1999**, *843*, 301.
7. Sanchez-Brunete, C.; Albero, B.; Martín, G.; Tadeo, J. L.; *Anal. Sci.* **2005**, *21*, 129.
8. Hajslová, J.; Holadova, K.; Kocourek, V.; Poustka, J.; Godula, M.; Cuhra, P.; Kempny, M.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *800*, 283.
9. Salvador, M.; Frenich, A. G.; González, F. J. E.; J. L.; Vidal, M.; *Chromatographia* **2006**, *64*, 667.
10. Erney, D. R.; Gillespie, A. M.; Gilvydis, D. M.; *J. Chromatogr., A* **1993**, *638*, 57.
11. Schenck, F. J.; Lehotay, S. J.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *868*, 51.
12. González, F. J. E.; Torres, M. E. H.; López, E. A.; Cuadros-Rodríguez, L.; Vidal, J. L. M.; *J. Chromatogr., A* **2002**, *996*, 155.
13. Hajslová, J.; Zrostlikova, J.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1000*, 181.
14. Poole, C. F.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1158*, 241.
15. Przblyski, C.; Hommet, F. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1201*, 78.
16. Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 987.
17. Menkissoglu-Spiroudi, U.; Fotopoulou, A.; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2004**, *84*, 15.
18. Moraes, S. L.; Rezende, M. O. O.; Nakagawa, L. E.; Luchini, L. C.; *Quim. Nova*, **2002**, *25*, 196.
19. Simonetti, P.; Gardana, C.; Riso, P.; Mauri, P.; Pietta, P.; Porrini, M.; *Nutr. Res.* **2005**, *25*, 717.
20. Lenucci, M. S.; Cadinu, D.; Taurino, M.; Piro, G.; Dalessandro, G. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2606.
21. Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; *Quím. Nova* **2009**, *32*, 92.

22. Pérez-Galvez, A.; Rios J. J.; Minguez-Mosquera, M. I.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 4820.
23. Cuadros-Rodriguez, L.; García-Campana, A. M.; Almansa-López, E.; Egea-González, F. J.; Cano, M. L. C.; Frenich, A. G.; Marínez-Vidal, J. L.; *Anal. Chim. Acta* **2003**, 478, 281.
24. Sanchez-Brunete, C.; Albero, B.; Martín. G.; Tadeo, J. L.; *Anal. Sci.* **2005**, 21, 129.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA ADSORÇÃO DE AGROTÓXICOS NO INJETOR E NA COLUNA DURANTE ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA GASOSA

3.1. INTRODUÇÃO

A expressão “aumento da resposta cromatográfica induzida por componentes da matriz”, ou simplesmente “efeito de matriz”, é utilizada para explicar as diferenças nas respostas do detector em análises de agrotóxicos por cromatografia em fase gasosa (CG). Esse fenômeno é comumente observado quando é obtida eficiência de extração de agrotóxico superior a 100% em análise de amostras complexas.¹ Essa superestimação de resultados ocorre principalmente quando soluções-padrão de agrotóxicos preparadas em solvente puro são empregadas como referência na quantificação dos mesmos agrotóxicos em extratos da matriz.^{2,3}

Essas diferentes respostas cromatográficas dos agrotóxicos em solvente puro e no extrato da matriz têm sido atribuídas à adsorção dos analitos no

insertor injetor, na coluna cromatográfica e no detector do CG durante as análises.^{4,5} Segundo Erney et al. (1993)², uma parte do agrotóxico, quando preparado em solvente puro, pode ser adsorvida no insertor do injetor. Porém, quando o agrotóxico está no extrato de matrizes complexas, a sua adsorção no insertor é afetada pela competição com os coextrativos. Por isso, maior quantidade de agrotóxicos é eluída na coluna cromatográfica, gerando repostas maiores.

Atualmente, o efeito de matriz é apenas minimizado, utilizando-se metodologias como limpeza^{2,5,6} e injeção com temperatura programada de vaporização.⁷⁻⁹ Além disso, há os procedimentos que promovem a compensação do efeito de matriz, como a utilização de analitos protetores,¹⁰⁻¹² função de correção^{13,14} e adição de padrão.¹⁵

Dentre os diversos métodos empregados para minimizar o efeito de matriz, o uso de soluções-padrão preparadas no próprio extrato da matriz tem refletido em melhores resultados.^{16,17} Entretanto, esse método apresenta algumas limitações, como instabilidade de alguns agrotóxicos quando estocados na presença dos componentes da matriz, contaminação do sistema cromatográfico e, conseqüentemente, aumento do custo de manutenção e custo das análises.

Estudos têm mostrado que a intensidade do efeito de matriz é dependente das propriedades físico-químicas dos agrotóxicos, como polaridade, massa molar, estabilidade térmica, temperatura de ebulição dos analitos, etc.^{4,18} Além disso, tem-se verificado que a adsorção de analitos no sistema cromatográfico também está relacionada com seu tempo de retenção. Por exemplo, o clorpirifós é um organofosforado de baixo tempo de retenção e que sofre efeito de matriz pouco significativo; já o da deltametrina é superior ao do clorpirifós e apresenta acentuado efeito de matriz.³

Embora o efeito de matriz seja caracterizado pela adsorção do agrotóxico no sistema cromatográfico, não há na literatura estudos detalhados sobre essa adsorção. O desconhecimento das características deste fenômeno e a contribuição de cada parte do sistema cromatográfico no processo, principalmente o injetor e a coluna, dificultam a elaboração de propostas eficazes para a eliminação do efeito de matriz.

Dentro de um amplo projeto envolvendo o efeito de matriz, este trabalho teve como objetivo investigar a adsorção de clorpirifós e deltametrina no

sistema CG-DCE (injetor e coluna) e a contribuição de cada componente do sistema nessa adsorção.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Reagentes

Soluções-padrão estoque de clorpirifós (99,0% m/m) e deltametrina (99,0 % m/m), obtidos da Chem Service (West Chester, PA, USA), foram preparadas em acetonitrila da Mallinckrodt/HPLC (Paris, França), na concentração de 500,0 mg L⁻¹, e armazenadas em temperatura de 4 °C. As soluções de trabalho individuais para clorpirifós e deltametrina foram preparadas, a partir da diluição das soluções estoque, em concentração de 5,0 mg L⁻¹ no mesmo solvente.

3.2.2. Cromatógrafo a gás com detector por captura de elétrons - CG-DCE

Foi utilizado um cromatógrafo a gás da Shimadzu (GC-17A), equipado com um detector por captura de elétrons (DCE) e uma coluna capilar HP-5 da Agilent Technologies, com fase estacionária composta de 5,0% fenilmetilsiloxano e 95,0% dimetilsiloxano (30 m x 0,25 mm d.i., 0,1 µm de espessura do filme), sendo o nitrogênio o gás de arraste (1,2 mL min⁻¹). A temperatura do detector foi 300 °C e o volume de amostra injetado foi 1 µL no cromatógrafo à razão de divisor 1:5. Foram feitos os ajustes necessários nas temperaturas da coluna e do injetor para o estudo da adsorção dos agrotóxicos.

3.2.3. Adsorção do clorpirifós e deltametrina no sistema cromatográfico

3.2.3.1. Adsorção dos agrotóxicos no injetor

A adsorção dos agrotóxicos no injetor foi avaliada a partir das respostas cromatográficas obtidas após a injeção de soluções-padrão de clorpirifós e de deltametrina, separadamente, nas concentrações de 5, 20, 50, 100, 300 e 500 µg L⁻¹ (duplicata) em diferentes de temperatura de injetor. A programação de temperatura da coluna cromatográfica foi mantida: temperatura inicial de 200 °C, aquecida a 10 °C min⁻¹ até 220 °C e, em seguida, aquecida a 50 °C min⁻¹ até 290 °C, permanecendo nesta última por 4 minutos. Após cada análise, o

sistema cromatográfico foi cuidadosamente limpo por injeções de acetonitrila nas mesmas condições de análises.

3.2.3.1.1. Adsorção do clorpirifós

As condições cromatográficas foram mantidas, e o efeito da temperatura do injetor na adsorção do clorpirifós foi avaliado nas seguintes condições: 310, 280, 250, 200, 170 e 150 °C, nesta ordem.

3.2.3.1.2. Adsorção da deltametrina

As condições cromatográficas foram mantidas, e por causa do elevado ponto de ebulição da deltametrina (acima de 400 °C), as isotermas de adsorção foram obtidas em temperaturas do injetor de 310, 280 e 250 °C.

3.2.3.1.3. Avaliação da presença da deltametrina na detecção do clorpirifós

As condições cromatográficas foram mantidas, e isotermas de adsorção foram construídas empregando-se o injetor nas temperaturas de 310, 280 e 250 °C. As análises foram realizadas com soluções-padrão contendo clorpirifós e deltametrina, ambos nas concentrações de 5 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.2.3.2. Adsorção do clorpirifós e deltametrina na coluna cromatográfica

A adsorção dos agrotóxicos na coluna foi avaliada a partir das respostas cromatográficas obtidas após a injeção de soluções-padrão contendo individualmente clorpirifós e deltametrina, na faixa de concentração de 5 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. As injeções foram realizadas mantendo fixa a temperatura do injetor (280 °C) e com duas programações de temperatura da coluna cromatográfica: a) temperatura inicial de 150 °C e aquecida a 10 °C min^{-1} até 290 °C, permanecendo nesta temperatura por 1 minuto, b) temperatura inicial de 150 °C, aquecida a 30 °C min^{-1} até 290 °C, permanecendo nesta última por 4 minutos. Esse mesmo procedimento foi empregado nas injeções de soluções-padrão contendo simultaneamente clorpirifós e deltametrina, ambos na faixa de concentração de 5 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como o efeito de matriz está associado à competição entre os analitos e os coextrativos da matriz por sítios ativos de adsorção no CG, procurou-se, então, estudar a adsorção dos analitos (clorpirifós e deltametrina) no injetor e na coluna cromatográfica separadamente.

3.3.1. Adsorção do clorpirifós no injetor

A adsorção do clorpirifós no injetor foi avaliada pela alteração das respostas cromatográficas ao injetar soluções-padrão de clorpirifós, na faixa de 5 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila, com o injetor em diferentes temperaturas. Foi obtida uma curva analítica para cada temperatura do injetor, conforme apresentado na Figura 3.1.

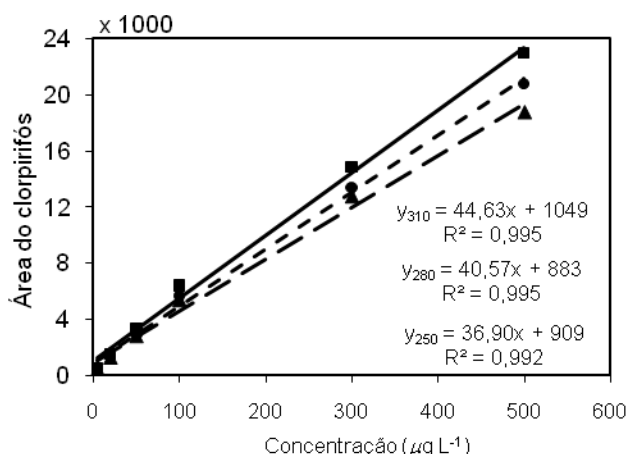


Figura 3.1. Curvas analíticas de soluções-padrão de clorpirifós, preparadas em acetonitrila, na faixa de concentração de 5 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e analisadas por CG-DCE com o injetor nas temperaturas: 310 (___); 280 (----) e 250 °C (___).

Para a mesma faixa de concentração, em diferentes temperaturas do injetor, as curvas analíticas apresentaram coeficientes angulares e lineares diferentes. Quanto maior a temperatura do injetor, maior foi o coeficiente angular, indicando um aumento da sensibilidade da análise. Este aumento da resposta, mostrada pelas equações ajustadas, pode ser atribuído à menor adsorção do agrotóxico no injetor em temperaturas maiores. Pelos dados das curvas ajustadas o aumento da resposta do clorpirifós, quando o injetor estava

a 310 °C em relação a 250 °C foi aproximadamente 21% $[(y_{310} - y_{250})/y_{250} \times 100]$.

Após cada análise de soluções-padrão de agrotóxico, foi necessária a injeção de acetonitrila pura para limpar o sistema cromatográfico. Resíduos de clorpirifós foram detectados, após análises cromatográficas para concentrações superiores a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ deste agrotóxico, nas três temperaturas do injetor. As áreas do sinal referente ao clorpirifós no cromatograma foram inferiores a 2,0% da área obtida para o sinal deste agrotóxico na eluição anterior.

Em temperaturas do injetor inferiores a 250 °C, a resposta cromatográfica do clorpirifós apresentou comportamento anômalo. A equação da reta obtida a 200 °C ($y = 42,69x + 353,2$) apresentou coeficiente angular superior à equação obtida a 250 °C ($y = 36,90x + 908,7$). Nenhum resíduo de agrotóxico foi detectado na análise da acetonitrila, com o detector a 200 °C, realizada após as injeções das soluções-padrão de clorpirifós de 5 a $500 \mu\text{g L}^{-1}$. É importante ressaltar que, nestas condições, a temperatura do injetor foi igual à temperatura inicial da coluna cromatográfica, não ocorrendo condensação de constituintes da amostra na entrada da coluna. Entretanto, no decorrer das análises cromatográficas com o injetor a 200 °C o clorpirifós apresentou dois sinais, indicando possíveis modificações em sua estrutura química. Na Figura 3.2 são apresentados os cromatogramas das análises do clorpirifós a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ realizadas com o injetor a 310, 280, 250, 200, 170 e 150 °C. Temperaturas do injetor abaixo de 200 °C não permitiram uma volatilização adequada do clorpirifós.

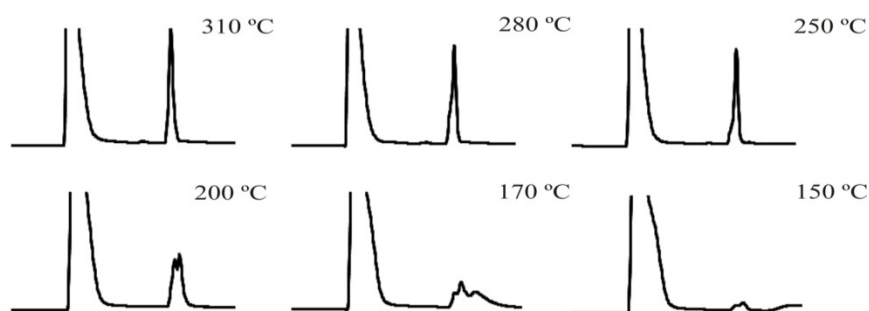


Figura 3.2. Cromatogramas de solução-padrão de clorpirifós a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ obtidos a partir das análises realizadas com o injetor 310, 280, 250, 200, 170 e 150 °C.

3.3.2. Adsorção da deltametrina no injetor

Análises de deltametrina nas temperaturas do injetor de 250 e 280 °C apresentaram coeficientes linear e angular das curvas analíticas ajustadas semelhantes, indicando superposição das curvas. Entretanto, com o injetor na temperatura de 310 °C, o coeficiente angular foi elevado, indicando que a quantidade de deltametrina que entra na coluna cromatográfica é também maior, o que pode ser observado na Figura 3.3.

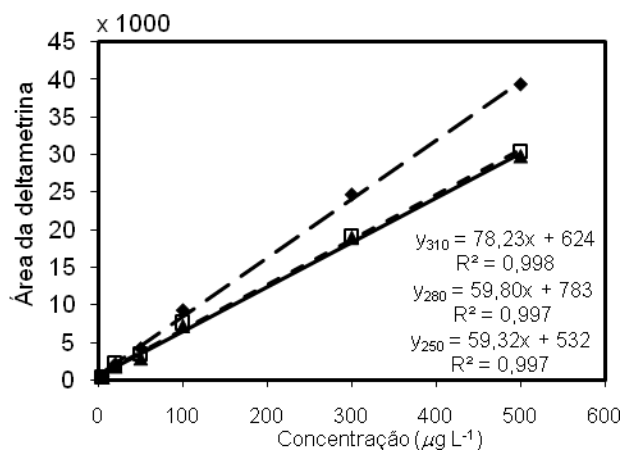


Figura 3.3. Curvas analíticas de soluções-padrão de deltametrina, preparadas em acetonitrila, na faixa de concentração de 5 a 500 µg L⁻¹, e analisadas por CG-DCE com o injetor nas temperaturas: 310 (_ _ _); 280 (-----); e 250 °C (____).

Isso significa que quanto maior a temperatura do injetor, menor é a quantidade de deltametrina adsorvida e, conseqüentemente, maior é a resposta cromatográfica. Considerando as curvas analíticas ajustadas para o injetor a 250 e 310°C, observou-se um aumento de aproximadamente 32% na resposta do detector $[(y_{310} - y_{250})/y_{250} \times 100]$. Essa quantidade foi superior ao resultado obtido para o clorpirifós (21%). Esses resultados sugerem que a adsorção da deltametrina no injetor é superior à do clorpirifós.

3.3.3. Avaliação da presença da deltametrina na detecção do clorpirifós

Foram construídas curvas analíticas a partir de soluções-padrão contendo os dois agrotóxicos nas mesmas concentrações (5 a 500 µg L⁻¹). Quando as soluções foram analisadas com o injetor a 250 e 310 °C, os resultados obtidos mostraram que, na presença da deltametrina, a diferença

entre as áreas do pico atribuído ao clorpirifós, com o injetor a 250 e a 310 °C, diminui para cerca de 10%, independente da concentração do clorpirifós. Isso indica um possível efeito protetor da deltametrina (Figura 3.4).

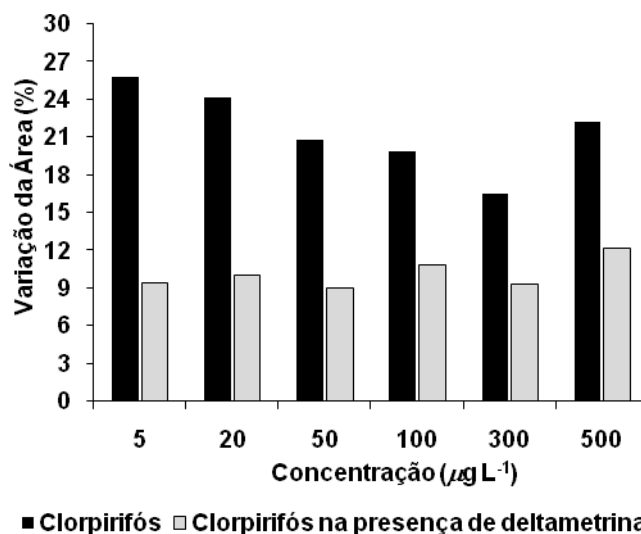


Figura 3.4. Porcentagem de variação da área atribuída ao clorpirifós e ao clorpirifós com deltametrina, em diferentes concentrações, obtida a partir de análises realizadas com o injetor a 250 e 310 °C $[(\bar{A}_{310} - \bar{A}_{250})/\bar{A}_{250} \times 100]$.

Embora a deltametrina seja um agrotóxico menos polar que o clorpirifós, ela apresenta massa molar maior, o que explica a maior temperatura de ebulição. Provavelmente, quando ambos os agrotóxicos são introduzidos no injetor (com divisor de fluxo), a deltametrina é adsorvida preferencialmente na superfície do insertor, na lã de vidro ou na entrada da coluna, diminuindo, assim, a interação do clorpirifós com as superfícies.

3.3.4. Adsorção do clorpirifós na coluna cromatográfica

Na literatura são encontrados poucos trabalhos descrevendo o efeito de matriz associado à coluna cromatográfica. No entanto, sabe-se que o tempo de retenção de substâncias polares diminui com o decréscimo da polaridade da coluna.¹⁹ A avaliação da adsorção de agrotóxicos na coluna pode ser realizada mantendo-se todas as condições cromatográficas constantes (temperatura de injetor, detector, fluxo, etc.) e variando a programação de temperatura da coluna, de forma que os agrotóxicos tenham diferentes tempos de retenção. O estudo da adsorção do clorpirifós e deltametrina na coluna cromatográfica foi

realizado variando a taxa de aquecimento. Estas condições e os t_r dos agrotóxicos obtidos em cada condição são descritos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Programações de temperatura da coluna cromatográfica utilizadas para estudar a adsorção de clorpirifós e deltametrina na coluna e seus respectivos tempos de análise e tempo de retenção dos agrotóxicos.

Programação	Tempo de análise	Tempo de retenção	
		Clorpirifós	Deltametrina
150 °C $\xrightarrow{10\text{ °C min}^{-1}}$ 290 °C (1min.)	15 min	5,8 min	14,1 min
150 °C $\xrightarrow{30\text{ °C min}^{-1}}$ 290 °C (4min.)	8,7 min	3,5 min	7,3 min

Utilizando as taxas de aquecimento da coluna cromatográfica, foram construídas curvas analíticas a partir de injeções de soluções-padrão do clorpirifós em acetonitrila. As equações das curvas analíticas obtidas para as análises realizadas a 10 e 30 °C min⁻¹ foram $y = 50,69 x + 1542$ ($R^2 = 0,993$) e $y = 45,74 x + 1256$ ($R^2 = 0,992$), respectivamente. Os resultados obtidos indicam que, em maior taxa de aquecimento, a resposta cromatográfica deste agrotóxico diminui. Além disso, quando a taxa de aquecimento reduziu de 30 para 10 °C min⁻¹, observou-se que a porcentagem de variação da área do clorpirifós apresentou valores diferentes em função da concentração (Figura 3.5). As soluções-padrão de clorpirifós em concentrações de 5 a 50 µg L⁻¹ apresentaram maiores porcentagens de variação da área, enquanto que em concentrações superiores a 100 µg L⁻¹ estas porcentagens reduziram-se tendendo a um valor constante (Figura 3.5).

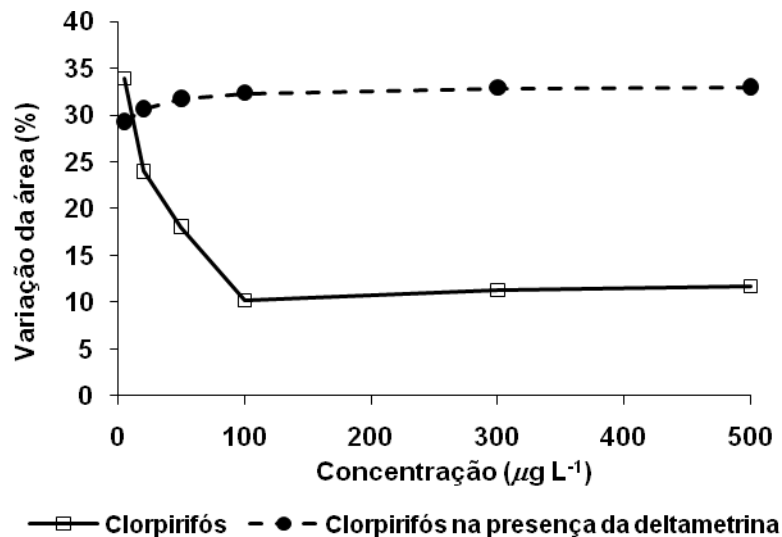


Figura 3.5. Porcentagem de variação da área atribuída ao clorpirifós e ao clorpirifós com presença da deltametrina, em diferentes concentrações, obtida a partir de análises realizadas com a taxa de aquecimento da coluna a 10 e 30 °C min⁻¹ [% = $(\bar{A}_{10} - \bar{A}_{30})/\bar{A}_{30} \times 100$].

Quando soluções-padrão de agrotóxicos, contendo ambos clorpirifós e deltametrina (5 a 500 µg L⁻¹), foram analisadas variando o aquecimento da coluna de 30 °C min⁻¹ para 10 °C min⁻¹, o aumento da área do clorpirifós foi aproximadamente 30% (Figura 3.5). Comparando os resultados apresentados na Figura 3.5, pode-se sugerir uma competição entre deltametrina e clorpirifós por sítios ativos da coluna cromatográfica. Nessa competição, a adsorção da deltametrina foi favorecida, pois maior quantidade de clorpirifós foi eluída na coluna cromatográfica com o aquecimento de 10 °C min⁻¹. A deltametrina, por ser um agrotóxico menos volátil, pode diminuir a adsorção do clorpirifós na entrada da coluna cromatográfica quando analisado em solvente, semelhante ao efeito dos coextrativos quando o clorpirifós é analisado em extratos de matrizes.

3.3.5. Adsorção da deltametrina na coluna cromatográfica

A adsorção da deltametrina na coluna cromatográfica também foi avaliada variando-se o aquecimento conforme descrito na Tabela 3.1. De forma semelhante ao clorpirifós, o aquecimento da coluna a 10 °C min⁻¹ apresentou maior área para a deltametrina em relação a área obtida com 30 °C min⁻¹. A

porcentagem de variação da área obtida para a deltametrina quando a programação de temperatura reduziu-se de 30 °C min⁻¹ para 10 °C min⁻¹ é mostrada na Figura 3.6.

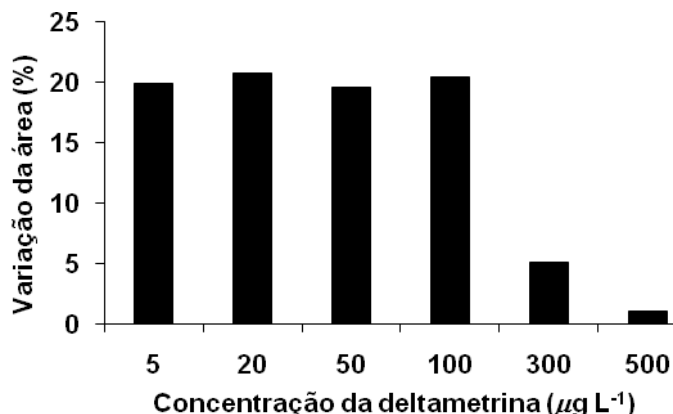


Figura 3.6. Porcentagem de variação da área atribuída à deltametrina, em diferentes concentrações, obtida a partir de análises realizadas com a taxa de aquecimento da coluna a 10 e 30 °C min⁻¹ [$\bar{A}_{10} - \bar{A}_{30} / \bar{A}_{30} \times 100$].

A porcentagem de variação da área foi constante para as análises das soluções-padrão de deltametrina em concentrações de 5 a 100 µg L⁻¹; já para soluções de concentrações superiores a 300 µg L⁻¹, as porcentagens de variação diminuíram significativamente (Figura 3.6).

3.4. CONCLUSÃO

A adsorção do clorpirifós e deltametrina no sistema cromatográfico foi influenciada tanto pela variação da temperatura do injetor quanto pela taxa de aquecimento da coluna cromatográfica.

A presença da deltametrina reduziu a adsorção do clorpirifós no injetor. Esse efeito protetor da deltametrina, agrotóxico de maior tempo de retenção, foi evidenciado nas análises do clorpirifós em diferentes temperaturas do injetor.

A deltametrina também influenciou na adsorção do clorpirifós na coluna cromatográfica, principalmente em concentrações superiores a 100 µg L⁻¹, favorecendo a eluição de maior quantidade de clorpirifós em taxas de aquecimento mais baixa da coluna (10 °C min⁻¹).

Por isso, para diminuir possíveis adsorções, as análises cromatográficas devem ser realizadas em temperaturas de injetor mais altas, respeitando-se a temperatura de decomposição dos analitos. De forma semelhante, a taxa de aquecimento da coluna deve ser menor.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Hajslová, J.; Holdova, K.; Kocourek, V.; Poustka, J.; Godula, M.; Cuhra, P.; Kempny, M.; *J. Chromatogr. A*, **1998**, 800, 283.
2. Erney, D. R.; Gillespie, A. M.; Gilvydis, D. M.; *J. Chromatogr., A* **1993**, 638, 57.
3. Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O.; *Quim. Nova* **2009**, 32, 987.
4. Poole, C. F.; *J. Chromatogr., A* **2007**, 1158, 241.
5. Schenck, F. J.; Lehotay, S. J.; *J. Chromatogr., A* **2000**, 868, 51.
6. Zrostikova, J.; Hajslova, J.; Godula, M.; Mastovska, E.; *J. Chromatogr., A* **2001**, 937, 73.
7. Pereira, A. S.; Neto, F. R. A; *Quím. Nova* **2000**, 23, 370.
8. Godula, M.; Hajslová, J.; Mastouska, K.; Krivanková, J.; *J. Sep. Sci.* **2001**, 24, 355.
9. Rantakokko, P.; Yritys, M.; Vartiainen, T.; *J. Chromatogr., A* **2004**, 1028, 179.
10. Anastassiades, M.; Mastovská, K; Lehotay, S. J.; *J. Chromatogr., A* **2003**, 1015, 163.
11. Erney, D. R.; Poole, C. F.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1993**, 16, 501.
12. Kirchner, M.; Huskova, R.; Matisova, E.; Mocak, J.; *J. Chromatogr., A* **2008**, 1186, 271.
13. Gonzáles, F. J. E.; Torres, M. E. H.; López, E. A.; Cuadros-Rodriguez, L.; Vidal, J. L. M.; *J. Chromatogr., A* **2002**, 996, 155.
14. Cuadros-Rodriguez, L.; García-Campana, A. M.; Almansa-López, E.; Egea-Gonzáles, F. J.; Cano, M. L. C.; Frenich, A. G.; Marínez-Vidal, J. L.; *Anal. Chim. Acta* **2003**, 478, 281.
15. Lehotay, S. J.; Eller, K. I.; *J. AOAC Int.* **1995**, 78, 821.
16. Menkissoglu-Spiroudi, U.; Fotopoulou, A.; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2004**, 84, 15.
17. Erney, D. R.; Pawlowski, T. M.; Poole, C. F.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1997**, 20, 375.
18. Sanchez-Brunete, C.; Albero, B.; Martín, G.; Tadeo, J. L.; *Anal. Sci.* **2005**, 21, 129.
19. Grob, K.; Grob, G.; *J. Chromatogr. A* **1981**, 219, 13.

CAPÍTULO 4

OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA (ELL-PBT) PARA ANÁLISE DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE MEL POR CROMATOGRAFIA GASOSA

4.1. INTRODUÇÃO

O mel de abelha é tradicionalmente consumido pelo ser humano, por ser considerado um produto de origem natural e saudável. Como tal, o mel deve estar livre de qualquer contaminante químico ou biológico para ser considerado seguro para o consumo humano. Entretanto, alguns trabalhos têm relatado a presença de resíduos de agrotóxicos em amostras de mel.^{1,2,3} Esses resíduos podem ser originários da aplicação direta de acaricidas nas colmeias de abelhas para controle de *Varroa jacobsonie* e *Ascospheara apis*. Os agrotóxicos mais comumente empregados são o amitraz, cimiazole, bromopropilato, cumafós, flumetrin, fluvalinato, imidacloprido e fipronil.^{4,5} Embora as agências regulatórias de vários países tenham estabelecido o limite máximo de resíduos

(LMR) de alguns desses agrotóxicos em amostras de mel, não estão incluídos no *Codex Alimentarius*.⁶

A contaminação indireta do mel pode ocorrer durante a aplicação de agrotóxicos na agricultura, que pode chegar até o solo, ar, água e também as flores, de onde as abelhas coletam o néctar para a produção do mel.⁷

De certa forma, as abelhas e o mel produzido servem como indicadores da poluição ambiental de determinada região.^{8,9} Concentrações elevadas de resíduos de agrotóxicos levam a alto índice de mortalidade das abelhas, além de produzir mel impróprio para consumo humano. Rissato et al.³ detectaram resíduos de malation em todas as amostras de mel analisadas na região de Bauru (São Paulo, Brasil). A presença de resíduos desses compostos nas amostras foi atribuída à aplicação do agrotóxico para controle do mosquito da dengue na área estudada.

A análise de resíduos de agrotóxicos em matrizes complexas consiste basicamente de quatro etapas: extração, limpeza dos extratos, identificação e quantificação dos compostos. Dentre os métodos de extração comumente empregados na análise de mel, destacam-se a extração em fase sólida,^{10,11} extração com fluido supercrítico,¹² extração líquido-líquido convencional,¹³ dispersão da matriz em fase sólida¹⁴ e microextração em fase sólida.¹⁵ A etapa de limpeza é baseada em técnicas auxiliares como a cromatografia de permeação em gel e de adsorção.^{16,17} A identificação e a quantificação dos resíduos de agrotóxicos são baseadas em cromatografia em fase gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).¹⁸

Recentemente, a técnica de extração líquido-líquido e purificação em baixa temperatura (ELL-PBT) surgiu como uma alternativa para a extração de agrotóxicos em água¹⁹ e em leite.²⁰ A extração se baseia na partição dos analitos entre a fase aquosa e orgânica, decorrente da diminuição da temperatura (- 20 °C). A vantagem do método é que os componentes da amostra são congelados com a fase aquosa, enquanto os agrotóxicos são extraídos pela fase orgânica.

Este trabalho teve como objetivo otimizar e validar o método de extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura para análise de agrotóxicos em mel por cromatografia gasosa. O método desenvolvido foi aplicado para extração de clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em amostras de mel.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Reagentes

Soluções-padrão estoque de clorpirifós (99,0% m/m), cipermetrina (92,4% m/m) e deltametrina (99,0% m/m), obtidos da Chem Service (West Chester, PA, USA), e λ -cialotrina (86,5% m/m), obtida da Syngenta (São Paulo, Brasil), foram preparadas em acetonitrila na concentração de 500 mg L⁻¹ e armazenadas a 4 °C. A partir da diluição das soluções estoque foram preparadas soluções de trabalho contendo os quatro agrotóxicos, em concentrações adequadas (50,0 mg L⁻¹ e 5,0 mg L⁻¹), no mesmo solvente. O mesmo procedimento foi empregado para o preparo da solução de bifentrina (92,2 % m/m – FMC do Brasil) a 5 mg L⁻¹, utilizada como padrão interno.

Foram utilizados como solventes o acetato de etila para análises de traços da Merck (Darmstadt, Alemanha), acetonitrila, metanol e hexano da Mallinckrodt/HPLC (Paris, França). Sulfato de sódio anidro e cloreto de sódio com grau de pureza superior a 99% foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Florisil (J. T. Baker) foi condicionado com acetonitrila e acetato de etila e, em seguida seco em estufa a 45 °C.

4.2.2. Otimização da ELL-PBT

Foram otimizadas as seguintes variáveis para a técnica proposta: massa da amostra de mel, alteração da força iônica, composição da mistura extratora, procedimento de homogeneização e massa de florisil para limpeza. Essas variáveis são descritas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Variáveis avaliadas no processo de otimização univariada da ELL-PBT de agrotóxicos em amostras de mel

Variáveis	Níveis
Massa de mel (g)	1, 2, 3 e 4
Força iônica	4,0 mL água 4,0 mL solução de NaCl 0,5 mol L ⁻¹
Mistura extratora (8,0 mL)	Acetonitrila, Acetonitrila/metanol (6,5 mL/1,5 mL) Acetonitrila/acetato de etila (6,5 mL/1,5 mL) Acetonitrila/acetato de etila (4 mL /4 mL) Hexano/acetato de etila (4 mL /4 mL)
Homogeneização	Vortex (30 segundos) Ultrassom (10 minutos) Mesa agitadora (40 minutos) Manual
Limpeza com florisil (g)	0, 1 e 2

Amostras de mel (Tabela 4.1) isentas de agrotóxicos foram colocadas em frascos de vidro transparente (22 mL) e aquecida a 50 °C em banho-maria, para diminuir a viscosidade. As amostras foram fortificadas com 100 µL de solução-padrão contendo os agrotóxicos clorpirifós, λ-cialotrina, cipermetrina e deltametrina a 5,0 mg L⁻¹ e homogeneizada. Às amostras fortificadas foram acrescentados 4,0 mL de fase aquosa e 8,0 mL de mistura extratora (Tabela 4.1). O sistema foi devidamente homogeneizado (Tabela 4.1). As amostras foram deixadas em repouso e, após a separação de fases, foram resfriadas a -20 °C por 6 horas. As fases orgânicas do sistema bifásico foram removidas e submetidas à limpeza em coluna de polietileno contendo florisil (Tabela 4.1) e 1,50 g de sulfato de sódio. Os extratos obtidos foram recuperados em balão volumétrico de 10,0 mL, contendo 100 µL de solução-padrão de bifentrina a 5,0 mg L⁻¹ (padrão interno) e armazenados no freezer até o momento da análise

por CG-DCE. Para as análises por CG-EM, os extratos foram secos em evaporador rotatório e recuperados em 100 μ L de acetonitrila.

4.2.3. Equipamentos de laboratório

Foram utilizados os seguintes equipamentos na etapa de preparo de amostras: (1) banho ultrassônico da Unique (São Paulo, Brasil); o gerador deste banho tem uma saída de 150 W e frequência de 25 kHz; (2) mesa agitadora (Tecnal TE – 420, São Paulo, Brasil) a 25 °C e 175 oscilações por minuto; e (3) vortex.

4.2.4. CG-DCE

Foi utilizado um cromatógrafo a gás da Shimadzu (GC-2014) com detector por captura de elétrons (DCE), equipado com autoinjeter AOC-20i e uma coluna capilar HP-5 da Agilent Technologies, com fase estacionária composta de 5% fenilmetilsiloxano e 95% dimetilsiloxano (30 m x 0,25 mm d.i., 0,1 μ m de espessura do filme), sendo o nitrogênio o gás de arraste (1,2 mL min^{-1}). A temperatura do injeter e do detector foi de 280 °C e 300 °C, respectivamente. A coluna inicialmente a 150 °C foi aquecida a uma taxa de 20 °C min^{-1} até 250 °C, e a 10 °C min^{-1} até 290 °C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos. Foi injetado 1 μ L de amostra no cromatógrafo a uma razão de *split* 1:5.

4.2.5. CG-EM

Foi utilizado um cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas da Shimadzu GCMS-QP5050A; equipado com autoinjeter AOC-5000 e uma coluna capilar HP-5 (Agilent Technologies), com fase estacionária composta de 5% fenilmetilsiloxano e 95% dimetilsiloxano (30 m x 0,25 mm d.i., 0,1 μ m de espessura do filme), sendo o hélio o gás de arraste (1,2 mL min^{-1}). As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do injeter 280 °C; a coluna, inicialmente a 150 °C, foi aquecida a uma taxa de 20 °C min^{-1} até 250 °C e a 10 °C min^{-1} até 290 °C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos. A temperatura de transferência da interface foi de 290 °C e uma injeção *splitless* foi usada. O detector de massas foi operado no modo impacto de elétrons (70 eV), com uma varredura na faixa de 30 a 600 *m/z* para o modo de varredura; também foi utilizado o modo de monitoramento de íons

selecionados. A identificação dos componentes dos extratos foi realizada por comparação com os dados espectrais da biblioteca (Wiley 330.000), com dados da literatura e também os dados das soluções-padrão dos agrotóxicos.

4.2.6. Validação do método

Alguns parâmetros analíticos da ELL-PBT, incluindo seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade do método, precisão e exatidão, foram avaliados conforme sugerido pelos protocolos das principais agências regulatórias.^{21, 22, 23}

4.2.7. Aplicação da técnica em amostras de mel

O método validado foi aplicado para determinação de agrotóxicos em 11 amostras de mel produzido no estado de Minas Gerais, Brasil.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Otimização da ELL-PBT

A técnica de ELL-PBT foi proposta inicialmente para a extração de agrotóxicos em meio homogêneo (água + acetonitrila) e posterior rompimento do equilíbrio pela diminuição da temperatura (fase sólida: água e mel; fase líquida: acetonitrila). Entretanto, os componentes do mel impedem a formação de uma fase única entre a acetonitrila e a água. Dessa forma, cinco variáveis (massa da amostra, força iônica, mistura extratora, homogeneização e limpeza) foram otimizadas para aumentar a porcentagem de extração dos agrotóxicos para a fase orgânica, como apresentado na Tabela 4.1 da parte experimental. As porcentagens de extração de cada um dos agrotóxicos em cada uma das condições otimizadas estão representadas nas Figuras 4.1 a.

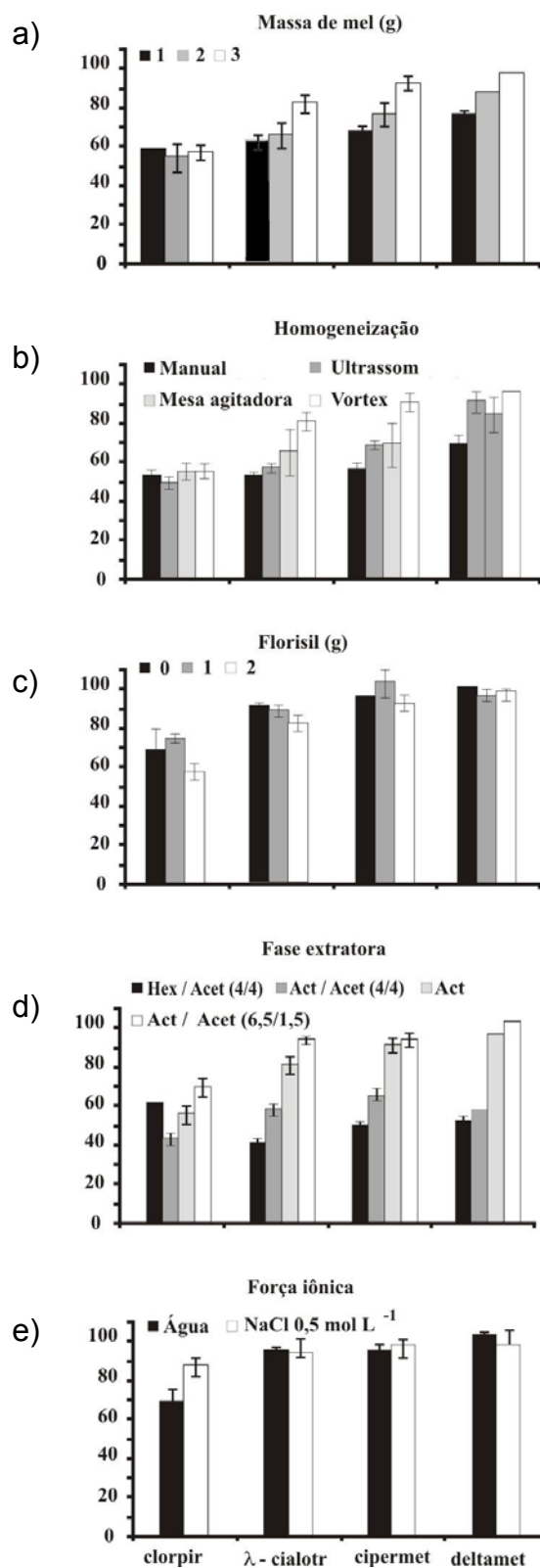


Figura 4.1. Porcentagens de extração de agrotóxicos obtidas na otimização da técnica de ELL-PBT de agrotóxicos em amostras de mel: a) massa de mel, b) procedimento de homogeneização, c) massa de florisil para limpeza, d) fase extratora e) força iônica.

4.3.1.1. Massa do mel

Foram utilizadas inicialmente diferentes quantidades de amostra (1,0; 2,0; 3,0; e 4,0 g) fortificadas com os quatro agrotóxicos na concentração de $0,17 \mu\text{g g}^{-1}$ ($50 \mu\text{g L}^{-1}$ no extrato). Pode-se observar na Figura 4.1 que o aumento da massa de mel proporcionou aumento na extração dos agrotóxicos para a fase orgânica, exceto para o organofosforado clorpirifós, que é mais solúvel em água em relação aos piretroides. Para os piretroides, a massa de 3g de mel proporcionou as maiores taxas de recuperação (deltametrina > cipermetrina > λ -cialotrina). Os resultados obtidos usando 4,0 g da amostra não foram apresentados na Figura 4.1a, pois o sistema bifásico (4 g de amostra: 8 mL de mistura extratora) não solidificou após permanência no freezer (-20°C).

4.3.1.2. Processo de homogeneização

Amostras de mel solubilizadas em água formam emulsão durante a etapa de homogeneização da amostra com a fase extratora. Isso pode ocasionar desvios elevados na análise, além de diminuir a porcentagem de recuperação. Foram avaliados quatro procedimentos, e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.1b. Pode-se observar que a agitação utilizando vortex por 30 segundos apresentou as maiores taxas de recuperação para os quatro agrotóxicos. O vortex promoveu a mistura das duas fases e, quando deixado em repouso (cerca de 1 minuto) observou-se novamente a formação do sistema bifásico sem formação de emulsão. A agitação com vortex por período superior a 30 segundos não melhorou a extração dos analitos. Já a utilização da mesa agitadora e do banho ultrassônico, além de demandar mais tempo para a homogeneização, não promoveu um contato efetivo entre as duas fases, obtendo por isso menores porcentagens de extração. A homogeneização manual, realizada de forma semelhante à extração líquido-líquido convencional, conduziu à formação de emulsão. O volume de fase orgânica obtido após o congelamento da amostra diminuiu significativamente (< 3 mL) e, conseqüentemente, a extração dos agrotóxicos não foi eficiente.

4.3.1.3. Limpeza com florisil

Neste trabalho, foram propostas duas etapas de limpeza, sendo a primeira durante o congelamento, em que parte dos componentes da matriz é solidificada com a água, e a segunda utilizando uma coluna com florisil (Tabela

4.1). Os componentes do mel remanescentes no extrato orgânico, principalmente os açúcares, interagem com a superfície do florisil, que é polar, e os resíduos de agrotóxicos são eluídos com o solvente. Os dados obtidos estão apresentados na Figura 4.1c. Os resultados indicaram que o aumento da massa de florisil diminui a porcentagem de recuperação para os quatro agrotóxicos, entretanto optou-se por utilizar a massa de 2 g de florisil, pois resultou em cromatogramas com menor número de interferentes (Figura 4.2).

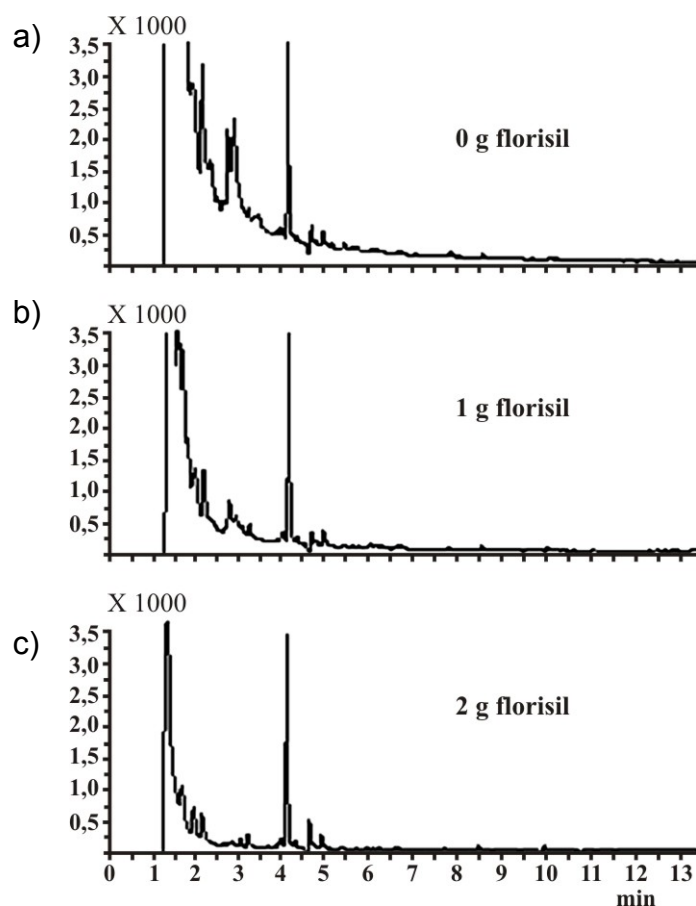


Figura 4.2. Cromatogramas obtidos após a ELL-PBT e limpeza utilizando diferentes quantidades de florisil de amostras de mel (isentas de agrotóxicos): A) 0g; B) 1g; C) 2g.

4.3.1.4. Mistura extratora

A mistura extratora constituída por 6,5 mL de acetonitrila e 1,5 mL de acetato de etila proporcionou maior porcentagem de recuperação (>70%). Embora comumente citada na literatura, a fase extratora constituída de hexano e acetato de etila 1:1, proporcionou extrações inferiores a 60% na ELL-PBT.³

Já a presença do metanol na mistura extratora (6,5 mL de acetonitrila e 1,5 mL de metanol) impediu o congelamento da fase aquosa.

4.3.1.5. Força iônica

Na extração líquido-líquido, a força iônica afeta sensivelmente a porcentagem de extração de agrotóxicos,²⁴ que foi avaliada alterando-se a força iônica da amostra com solução de NaCl 0,5 mol L⁻¹, como descrito na Tabela 4.1 da parte experimental. Com uso da força iônica, a porcentagem de recuperação do clorpirifós foi significativamente maior, não mostrando esta mesma tendência para os demais agrotóxicos.

4.3.2. Validação do método

Após a otimização da ELL-PBT, o método proposto foi validado. Para isso, 3,00 g de mel foram dissolvidos em 4,0 mL de solução de NaCl 0,5 mol L⁻¹ e colocados em contato com 8,0 mL de mistura extratora (6,5 mL de acetonitrila + 1,5 mL de acetato de etila). O sistema foi homogeneizado no vortex por 30 segundos, congelado a -20 °C, e a fase orgânica líquida foi eluída em coluna de polietileno contendo 2,0 g de florisil. O extrato obtido foi analisado por CG-DCE.

4.3.2.1. Seletividade

Na Figura 4.3, é apresentado o cromatograma de uma solução-padrão dos agrotóxicos em acetonitrila. A presença de mais de um pico para os piretroides (compostos 3, 4 e 5) é atribuída à conversão em isômeros durante a injeção das amostras no cromatógrafo a gás.²⁵ A quantificação desses piretroides foi realizada considerando-se a soma das áreas dos picos dos isômeros nos cromatogramas das amostras e dos padrões. Quando comparado com a Figura 4.2, observa-se que o método foi seletivo, uma vez que o tempo de retenção dos agrotóxicos analisados foi superior a 5 minutos, e o mel analisado não apresentou sinais de interferentes nesta região dos cromatogramas.

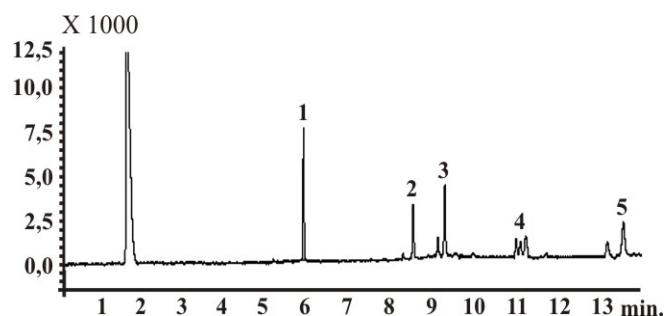


Figura 4.3. Cromatograma de solução-padrão dos agrotóxicos em acetonitrila a $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Os números dos picos (1, 2, 3, 4 e 5) se referem aos compostos clorpirifós, bifentrina (padrão interno), λ -cialotrina, cipermetrina, deltametrina, respectivamente.

4.3.2.2. Limite de detecção, limite de quantificação e linearidade

O limite de detecção (LD) para o método proposto foi determinado considerando o valor ≥ 3 vezes a área do sinal da linha de base (ruído) obtido para amostras de mel isentas de agrotóxicos (branco) e analisadas por CG-DCE. O limite de quantificação (LQ) foi determinado considerando a área do sinal pelo menos 10 vezes maior que a área do sinal do ruído. O limite de detecção e quantificação para o clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina foram inferiores a $0,017 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,033 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente (Tabela 4.2).

A linearidade do método foi avaliada analisando-se extratos obtidos a partir da ELL-PBT de amostras de mel que foram fortificadas com agrotóxicos nas concentrações $0,033$; $0,067$; $1,7$; $3,3$; $6,7$; $10,0$; $16,7 \mu\text{g g}^{-1}$. Coeficiente de determinação (r^2) para as curvas analíticas dos quatro agrotóxicos foi superior a $0,99$ (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade do método

Agrotóxicos	t_R (min)	Dados da calibração		LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
		Equações	r^2		
Clorpirifós	5,79	$y = 5,975x + 0,570$	0,999	0,017	0,033
λ -cialotrina	9,19	$y = 7,216x - 0,006$	0,999	0,017	0,033
Cipermetrina	10,91	$y = 6,647x + 0,099$	0,999	0,017	0,033
Deltametrina	13,40	$y = 7,751x - 0,000$	0,996	0,017	0,033

4.3.2.3. Exatidão e precisão do método

Para determinar a exatidão do método, amostras de mel (isentas de agrotóxicos) foram fortificadas com 0,033; 0,067; 0,33 μg de agrotóxicos/g de amostra. A taxa de recuperação obtida para o método proposto variou de 84 a 100%, com desvio-padrão relativo inferior a 10 %. A precisão do método foi determinada em termos de desvio-padrão relativo (DPR) para sete extrações idênticas de amostra de mel fortificadas com 0,17 $\mu\text{g g}^{-1}$ e análise por CG. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Porcentagens de recuperação dos quatro agrotóxicos, após extração da amostra de mel fortificada em quatro concentrações diferentes

Concentração		Recuperação (%) (média \pm DPR)			
extrato ($\mu\text{g L}^{-1}$)	mel ($\mu\text{g g}^{-1}$)	clorpirifós	λ -cialotrina	cipermetrina	deltametrina
10 ^a	0,033	84,6 \pm 4,2	95,5 \pm 2,9	100,9 \pm 4,4	97,2 \pm 9,9
20 ^a	0,067	86,4 \pm 7,5	94,2 \pm 3,5	94,5 \pm 5,8	94,3 \pm 5,4
50 ^b	0,17	87,8 \pm 4,0	94,7 \pm 6,6	97,8 \pm 6,8	98,4 \pm 7,8
100 ^a	0,33	85,9 \pm 4,2	92,8 \pm 2,3	98,1 \pm 0,6	96,4 \pm 0,9

^aResultados representam uma média de três repetições.

^bResultados representam uma média de sete repetições.

4.3.3. Aplicação do método em amostras de mel

O método validado foi aplicado para análise de 11 amostras de mel provenientes de oito regiões diferentes do estado de Minas Gerais. Observou-se no cromatograma de uma das amostras de mel um sinal em 11 minutos, coincidente com o tempo de retenção da cipermetrina. Esse resultado foi um falso positivo que foi comprovado pela análise dos cromatogramas do CG-EM que mostrou se tratar de um interferente.

Resíduos de clorpirifós foram detectados em duas amostras de mel, e uma das amostras apresentou contaminação de $0,10 \mu\text{g g}^{-1}$ (Figura 4.4). Também foi detectado resíduo de λ -cialotrina em outra amostra, e concentração de $0,22 \mu\text{g g}^{-1}$. A presença desses agrotóxicos nas amostras de mel foi comprovada utilizando CG-EM operando no modo MIS. Além do tempo de retenção, os íons utilizados para a identificação da λ -cialotrina foram m/z 181, 197 e 208, e para o clorpirifós foram m/z 97, 197, 314, 349 (Figura 4.4). Embora os órgãos oficiais não estabeleçam limite máximo de resíduos desses agrotóxicos em amostras de mel, essas concentrações são inferiores ao LMR estabelecidos para resíduos desses agrotóxicos em amostras de alimentos. ($< 1 \mu\text{g g}^{-1}$).

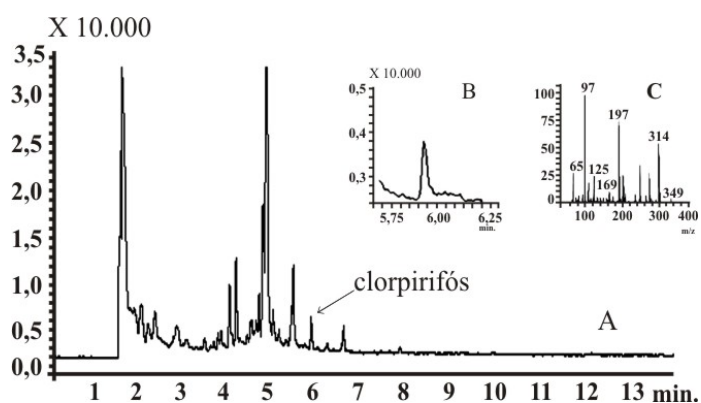


Figura 4.4. Cromatogramas de extrato obtido a partir da ELL-PBT de amostra de mel contaminada com resíduo de clorpirifós: A) Análise por CG-DCE; B) Análise por CG-EM no modo MIS; C) Espectro de massas do clorpirifós.

4.4. CONCLUSÃO

A otimização da ELL-PBT para extração de resíduos de agrotóxicos em amostras de mel e análise por CG-DCE resultou em um método simples, eficaz e de baixo custo. As porcentagens de recuperação foram superiores a 84% e desvio-padrão relativo inferior a 10%. A grande vantagem dessa técnica é o baixo consumo de solventes para a extração dos agrotóxicos. A modificação da polaridade da fase extratora (acetonitrila) adicionando pequena quantidade de acetato de etila favoreceu a extração dos agrotóxicos, principalmente dos piretroides. Entretanto, o aumento da força iônica do meio resultou em maior porcentagem de extração do clorpirifós. A etapa de limpeza com florissil foi necessária para remover coextrativos do mel, que variam muito de uma amostra para outra. Finalmente, o método proposto possibilitou a quantificação de resíduos de clorpirifós e λ -cialotrina em amostras de mel e a confirmação dos contaminantes por CG-EM.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kadar, A.; Faucon, J.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9741.
2. Pirard, C.; Widart, J.; Nguyen, B. K.; Deleuze, C.; Heudt, L.; Haubruge, E.; De Pauw, E.; Focant, J. F.; *J. Chromatogr. A.* **2007**, *1152*, 116.
3. Rissato, S. R.; Galhiane, M. S.; Almeida, M. V.; Gerenutti, M.; Apon, B. M.; *Food Chem.* **2007**, *101*, 1719.
4. Korta, E.; Bakkali, A.; Berrueta, L. A.; Gallo, B.; Vicente, F.; *J. Chromatogr. A.* **2001**, *930*, 21.
5. Rial-Otero, R.; Gaspar, E. M.; Moura, I.; Capelo, J. L.; *Talanta.* **2007**, *71*, 503.
6. Codex Alimentarius (1998). Draft revised for honey at step 6 of the Codex Procedure. CX 5/10.2, CL 1998/12-S
7. Kujawski, M. W.; Namiesnik, J.; *Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 785.
8. Celli, G.; Maccagnani, B.; *Bull. Insectol.* **2003**, *56*, 137.
9. Kevan, P. G.; *Ecosyst. Environ.* **1999**, *74*, 373.
10. Albero, B.; Sánchez-Brunete, C.; Tadeo, J. L.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5828.
11. Blasco, C.; Fernández, M.; Pena, A.; Lino, C.; Silveira, M. I.; Font, G.; Picó, Y.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 8132.
12. Rissato, S. R.; Galhiane, M. S.; Knoll, F. R. N.; Apon, B. M.; *J. Chromatogr. A.* **2004**, *1048*, 153.
13. Blasco, C.; Lino, C.; Pico, M. Y.; Pena, A.; Font, G.; Silveira, M. I. N.; *J. Chromatogr. A.* **2004**, *1049*, 155.
14. Fernández, M.; Pico, Y.; Manes, J.; *Chromatographia.* **2002**, *56*, 577.
15. Campillo, N.; Penalver, R.; Aguinaga, N.; Hernandez-Cordoba, M.; *Anal. Chim. Acta.* **2006**, *562*, 9.
16. Fernandez, M.; Pico, Y.; & Manes, J.; *J. Food Protect.* **2002**, *65*, 1502.
17. Rossi, S.; Dalperoa, A. P.; Ghinia, S.; Colombob, R.; Sabatinib, A. G.; Girottia, S.; *J. Chromatogr. A.* **2001**, *905*, 223.
18. G. Van der Hoff, G. R., Van Zoonen, P.; *J. Chromatogr. A.* **1999**, *843*, 301.
19. Vieira, H. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; *Quím. Nova.* **2007**, *30*, 535.
20. Goulart, S. M.; Queiroz, M. E. L. R.; Neves, A. A.; *Talanta.* **2008**, *75*, 1320.
21. ANVISA, Portaria No. 1.469/2000 of 29 December. National Health Agency, Brazil.

22. INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008 (2003).
23. European Commission – Directorate General Health and consumer protection – Guidance document on residue analytical methods, SANCO/825/00 (2000).
24. Wang, X.; Zhao, X.; Liu, X.; Li, Y.; Fu, L.; Hu, J.; Huang, C. *Anal. Chim. Acta.* **2008**, 620, 162.
25. Mastovská, K.; Lehotay, S. J.; *J. Chromatogr. A.* **2004**, 1040, 259.

CAPÍTULO 5

INFLUÊNCIA DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE DIFERENTES MATRIZES NA RESPOSTA CROMATOGRÁFICA DE AGROTÓXICOS

5. 1. INTRODUÇÃO

A cromatografia gasosa (CG) é atualmente a técnica mais utilizada para análises de resíduos de agrotóxicos em diversas matrizes ambientais. Isso se deve ao elevado potencial de separação de compostos em misturas complexas e o baixo limite de detecção alcançado pelos detectores convencionais do CG.¹ Entretanto, durante as análises cromatográficas os componentes da matriz contidos nos extratos podem influenciar na quantificação dos analitos de interesse, gerando resultados duvidosos. Este fenômeno é denominado de aumento da resposta cromatográfica induzida pelos componentes da matriz ou efeito de matriz.^{2,3}

O efeito de matriz é dependente das propriedades físico-química dos agrotóxicos e das características dos componentes endógenos da matriz

(tamanho das moléculas, polaridade, estabilidade térmica, pressão de vapor, etc).^{2, 4, 5, 6} Para minimizar a influência dos componentes da matriz na quantificação de agrotóxicos são utilizadas estratégias como limpeza,⁵ injeção no topo da coluna,^{3, 7} e injeção com temperatura programada de vaporização.^{8, 9, 10} Também existem os procedimentos que promovem a compensação da ocorrência do efeito de matriz como a utilização de analitos protetores,^{11, 12, 13} função de correção,^{14, 15} adição de padrão¹⁶ e curva analítica preparada pela dissolução dos padrões em extratos da matriz.^{17, 18}

Dentre os diversos métodos empregados para minimizar o efeito de matriz, a limpeza dos extratos é o único que efetivamente elimina a causa do problema, ou seja, a remoção dos componentes da matriz. Para a limpeza dos extratos são utilizadas técnicas como extração em fase sólida,^{19, 20} extração líquido-líquido e cromatografia por permeação em gel.²¹ Além dessas técnicas existem também as que proporcionam a extração dos analitos e a limpeza dos extratos simultaneamente, como a dispersão da matriz em fase sólida (DMFS)^{22, 23} e mais recentemente, a extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT).^{24, 25} Entretanto, a remoção exaustiva dos componentes da matriz pode conduzir a baixa recuperação dos agrotóxicos, o que torna as técnicas de extração ou purificação inadequadas.

Dessa forma, os métodos de extração existentes não eliminam definitivamente os coextrativos, e a presença destes compostos remanescentes proporcionam alterações da resposta cromatográfica. Por exemplo, em análises de agrotóxicos termodegradáveis, preparados em solvente puro, são obtidos baixas respostas, entretanto, análises destes mesmos compostos em extratos contendo carboidratos, proteínas e lipídios, obtidos a partir da ELL e limpeza com EFS, são obtidas respostas intensas.²⁶

Recentemente, em um estudo minucioso, Przybylski & Hommet²⁷ fizeram uma comparação entre os coeficientes angular das curvas analíticas obtidas a partir de soluções- padrão de 12 agrotóxicos preparadas em solvente e em extratos de cinco matrizes individuais (Carrot, alimento infantil, Green bean, batata, Split peas). Os resultados indicaram que o efeito de matriz quantificado pelos coeficientes angulares das curvas analíticas (razão entre coeficientes angulares matriz/solvente) pode ser positivo (razão > 1) ou negativo (razão <1), dependendo das características dos agrotóxicos e da complexidade da matriz em análise por cromatografia gasosa.

Vários outros estudos, como o relatado por Mastovska et al.²⁸ procuraram contornar o problema do efeito de matriz comparando as respostas cromatográficas de agrotóxicos preparados em solvente puro com as respostas dos mesmos compostos em misturas de extratos de frutas (maçã, uva, pêssigo e ameixa) e misturas de extratos de vegetais (couve-flor, tomate, pepino e pimentão).

A avaliação dos efeitos de várias variáveis na resposta de um processo de quantificação pode tornar-se uma tarefa árdua quando esse número de variáveis é muito grande. A ACP é freqüentemente usada para a redução da dimensionalidade em alguns problemas químicos.²⁹ O objetivo da ACP é comprimir os dados dentro de um conjunto de novas variáveis, sendo uma combinação linear de variáveis originais, maximizando a descrição da variância de dados. A matriz de dados originais (X) de m linhas (objetos ou amostras) e n colunas (variáveis) é decomposta numa matriz de escores, S (m, f), matriz de pesos, L (n, f), e os resíduos E (m, n): $X = SL' + E$, enquanto f é o número de componentes principais significantes. As colunas da matriz dos escores são conjuntos de novas variáveis ortogonais, chamadas componentes principais (PCs). Os consecutivos PCs descrevem cada vez menos a variância dos dados (PC1 > PC2 > PC3, etc.). Os elementos da matriz de pesos informam sobre a contribuição das variáveis originais a cada construção de CP.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência dos componentes das matrizes tomate, leite, maçã, mel, solo, batata, fígado, alcatra e água nas respostas cromatográficas dos agrotóxicos clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, comumente encontrados nestes tipos de amostras. As porcentagens de variação das respostas cromatográficas dos agrotóxicos em cada amostra foram submetidas à análise de componentes principais (ACP) e Análise Hierárquica de Agrupamentos (AHA).

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Reagentes

Soluções-padrão estoque de clorpirifós (99,0% m/m), cipermetrina (92,4% m/m) e deltametrina (99,0% m/m), obtidos da Chem Service (West Chester, PA, USA), e λ -cialotrina (86,5% m/m), obtida da Syngenta (São Paulo, Brasil), foram preparadas em acetonitrila na concentração de 500,0 mg L⁻¹ e

armazenadas em temperatura de 4 °C. A partir da diluição das soluções estoque, foram preparadas duas soluções contendo os quatro agrotóxicos em concentrações de 50,0 e 5,0 mg L⁻¹ no mesmo solvente. O mesmo procedimento foi empregado para o preparo da solução de bifentrina (92,2 % m/m – FMC do Brasil), 5,0 mg L⁻¹, utilizada como padrão interno.

Como solventes foram utilizados o acetato de etila para análises de traços da Merck (Darmstadt, Alemanha) e acetonitrila da Mallinckrodt/HPLC (Paris, França). Sulfato de sódio anidro com grau de pureza superior a 99% foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Florisil (J. T. Baker) foi condicionado com acetonitrila e acetato de etila e secado em estufa em 45 °C.

5.2.2. Procedimento analítico

5.2.2.1. Preparo dos extratos orgânicos de amostras por extração sólido-líquido ou extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT ou ELL-PBT)

Extratos orgânicos de amostras de tomate, maçã, solo, batata, fígado e alcatra e extratos orgânicos de amostras de leite, mel e água foram obtidos a partir das técnicas de ESL-PBT e ELL-PBT, respectivamente.^{24, 25, 29-33} Para isso, uma determinada quantidade da amostra (Tabela 5.1) foi transferida para frasco de vidro transparente (22 mL) e, em seguida, foi adicionada a mistura extratora (Tabela 5.1). O sistema foi submetido a homogeneização (Tabela 5.1) e resfriado em freezer a -20 °C por 6 horas. Após este período, foi obtido um sistema bifásico constituído da fase sólida (congelamento da fase aquosa e da matriz) e da fase líquida (sobrenadante). Este líquido foi passado por 1,50 g de sulfato de sódio anidro. O filtrado obtido (extrato) foi recuperado em balão volumétrico de 10,0 mL, com acetonitrila e a solução foi armazenada no freezer, até o momento da análise por CG-DCE. Na Tabela 5.1 são descritas as condições específicas para o preparo de cada amostra.

Tabela 5.1. Descrição do preparo dos extratos de nove matrizes empregando a ELL-PBT ou ESL-PBT: quantidade de amostra, composição da mistura extratora e forma de homogeneização

N ^o	Matriz	Quant.	Mistura extratora			Homogeneização	Ref.
			Acetonitrila	Acetato de etila	Água		
1	Alcatra	3,0 g	6,5 mL	1,5 mL	1,0 mL	Ultrassom (10 min.)	33
2	Água	4,0 mL	6,5 mL	1,5 mL	-	Mesa agitadora (15 min.)	30
3	Fígado	3,0 g	8,0 mL	-	1,0 mL	Ultrassom (10 min.)	33
4	Leite	4,0 mL	8,0 mL	-	-	Mesa agitadora (20 min.)	24
5	Maçã ^a	3,0 g	8,0 mL	-	1,0 mL	Mesa agitadora (30 min.)	34
6	Solo	1,0 g	6,5 mL	1,5 mL	4,0 mL	Ultrassom (20 min.)	30
7	Mel ^a	3,0 g	6,5 mL	1,5 mL	4,0 mL	Vortex (30 seg.)	31
8	Batata	3,0 g	6,5 mL	1,5 mL	1,0 mL	Ultrassom (10 min.)	32
9	Tomate	4,0 g	8,0 mL	1,5 mL	0,5 mL	Ultrassom (10 min.)	25

^aExtratos orgânicos líquidos foram passados por colunas com 2,0 g de florisil e 1,50 de sulfato de sódio.

5.2.3. Equipamentos e condições de análises

5.2.3.1. Equipamentos de laboratório

Foi utilizado um banho ultrassônico da Unique (São Paulo, Brasil) durante o preparo das amostras. O gerador deste banho tem uma saída de 150 W e uma frequência de 25 kHz. Também foi utilizada uma mesa agitadora (Tecnal TE – 420, São Paulo, Brasil) a 25 °C e 175 oscilações por minuto e um vortex.

5.2.3.2. CG-DCE

Foi utilizado um cromatógrafo a gás da Shimadzu (GC-2014) equipado com um detector por captura de elétrons (DCE) e uma coluna capilar HP-5 da Agilent Technologies, com fase estacionária composta de 5% fenilmetilsiloxano e 95% dimetilsiloxano (30 m x 0.25 mm d.i., 0,1 μm de espessura do filme), sendo o nitrogênio o gás de arraste (1,2 mL min⁻¹). A temperatura do injetor e detector foram 280 e 300°C, respectivamente. A coluna inicialmente a 150 °C foi aquecida a 10 °C min⁻¹ até 290 °C, permanecendo nessa temperatura por 1 minuto. Foi injetado 1 μL de amostra no cromatógrafo a uma razão de divisor de 1:5.

5.2.4. Avaliação da resposta cromatográfica dos agrotóxicos após saturação do CG

Avaliou-se o efeito da saturação do sistema cromatográfico por componentes das matrizes nas respostas dos agrotóxicos clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina. Soluções-padrão dos agrotóxicos a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, preparadas em acetonitrila, foram injetadas sucessivamente no CG-DCE (cinco repetições). Em seguida, o sistema cromatográfico foi saturado com cinco injeções sucessivas de extratos orgânicos de uma determinada matriz (tomate, leite, maçã, mel, solo, batata, fígado, alcatra ou água). Novamente, a mesma solução padrão a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi injetada (cinco repetições).

5.2.5. Análise das Componentes Principais (ACP)

Para reduzir o número das variáveis (componentes principais) mais significativas o valor da porcentagem de variação das respostas cromatográficas dos agrotóxicos $[(\bar{A}_{\text{depois}} - \bar{A}_{\text{antes}})/\bar{A}_{\text{antes}}]$ foi transformado em uma matriz. Essa matriz apresenta nove objetos (tipos de extratos, linhas) e quatro variáveis (agrotóxicos, colunas). Os dados foram autoescalonados e, em seguida, foram submetidos à análises das componentes principais (ACP) usando o software PLS-Toolbox (versão 2.1, Engenvektor Research, Inc., USA).

5.2.6. Curvas analíticas

Foram preparadas curvas analíticas utilizando o método da padronização interna. Dez séries de soluções-padrão contendo os quatro agrotóxicos nas concentrações de 5; 20; 50; 100; 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram preparadas. A primeira série foi obtida pela diluição das soluções de trabalho (50 e 5 mg L^{-1}) contendo os quatro agrotóxicos em acetonitrila. Outras nove séries de soluções-padrão foram preparadas por diluições das mesmas soluções de trabalho (50 e 5 mg L^{-1}) em extratos de amostras individuais (tomate, leite, maçã, mel, solo, batata, fígado, alcatra e água) em duplicata. Estes extratos foram obtidos a partir da ESL-PBT ou ELL-PBT de amostras isentas de resíduos de agrotóxicos.

5. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Variação da resposta cromatográfica após saturação do CG

Após a saturação do CG com extratos orgânicos de alcatra, água, fígado, leite, maçã, solo, mel, batata e tomate as respostas cromatográficas dos agrotóxicos, em acetonitrila, variaram entre - 20 e 300% (Tabela 5.2). Essas porcentagens de variação das áreas atribuídas aos agrotóxicos foram determinadas empregando a equação $[\%=(\bar{A}_{\text{Após}} - \bar{A}_{\text{Antes}})/\bar{A}_{\text{Antes}}\times 100]$.

Tabela 5.2. Porcentagens de variação das respostas cromatográfica dos agrotóxicos obtidas após a saturação do CG-DCE com nove extratos de matriz

ACP	Amostra	Clorpirifós	λ -cialotrina	Cipermetrina	Deltametrina
1*	Alcatra	17,2	14,3	16,3	32,9
2	Água	-3,0	-5,2	-4,2	-0,0
3	Fígado	25,6	23,2	34,1	38,2
4	leite	7,0	6,8	16,1	45,1
5	Maçã	2,3	-16,7	-18,2	-20,3
6	Solo	3,5	-5,8	-6,1	-8,3
7	Mel	5,8	-9,4	-11,7	-11,9
8	Batata	11,7	15,6	18,4	19,5
9	Tomate	9,9	102,8	162,3	301,6

* Esses números se referem às identificações dos extratos no ACP da Figura 5.1.

Os dados da Tabela 5.2 foram utilizados para construir a análise de componentes principais (Figura 5.1).

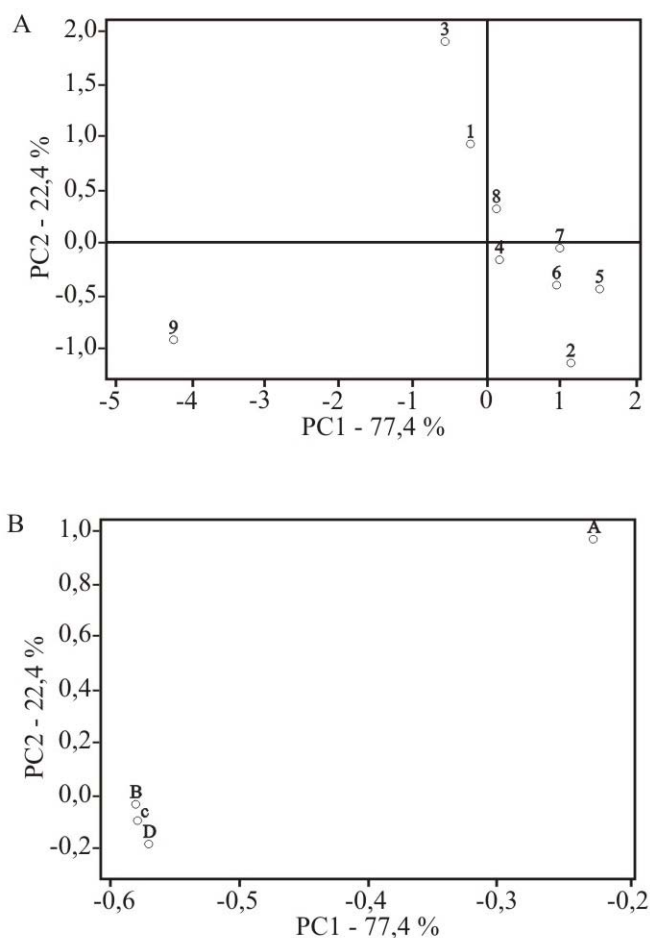


Figura 5.1. Escores normalizados (A) e pesos (B) de amostras (1-9) como função da variação da resposta cromatográfica dos agrotóxicos (A. clorpirifós, B. λ -cialotrina, C. cipermetrina e D. deltametrina). As identificações das amostras estão na Tabela 5.1.

Pode-se observar na figura 5.1 que a componente principal 1 (CP1) explicou 77,4% da variância total, e mostrou que o aumento da resposta dos piretroides λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina (B, C e D, respectivamente) são responsáveis pela separação de extratos de tomate (9) dos demais extratos. O aumento da resposta cromatográfica destes agrotóxicos devido à saturação do CG com extratos de tomate variaram entre 100 e 300%, dependendo do tempo de retenção do piretroide. Provavelmente, isso se deve à competição por sítios de adsorção no CG entre carotenoides e agrotóxicos. Para os demais extratos o aumento da resposta dos piretroides variou entre 0 e 45% (Tabela 5.2).

Um significativo aumento da resposta do clorpirifós (> 25%) em extratos de fígado (3) foi observado em relação aos demais tipos de amostras, o qual é mostrado pela CP2 (22,4% de variância). Esse aumento da resposta cromatográfica foi o que influenciou no distanciamento desse extrato dos demais (Figura 5.1). Extratos de alcatra (1) e fígado (3) estão agrupados no mesmo quadrante, pois apresentam composição química semelhante,³⁵ porém, extratos de alcatra proporcionaram um efeito de matriz menor para os agrotóxicos.

Os extratos de água (2), maçã (5), solo (6) e mel (7) formaram um subgrupo caracterizado pela redução da resposta cromatográfica (efeito de matriz negativo), principalmente para os piretroides. A água é considerada uma matriz simples, apresentando variação da resposta cromatográfica inferior a 5,2% para todos os agrotóxicos. O solo, embora seja considerado uma amostra complexa, apresentou extratos limpos quando submetidos à ESL-PBT, proporcionando variação da resposta inferior a 8,3% para os piretróides. As amostras de maçã e mel apresentaram extratos com maiores quantidades de componentes endógenos, dessa forma estes interferentes proporcionaram reduções efetivas da resposta cromatográfica dos piretroides, principalmente em extratos de maçã (aproximadamente - 20%).

Os extratos da batata (8) e do mel (7) são ricos em carboidratos. O extrato da batata apresenta em sua composição química o amido (polissacarídeo), sendo observado um efeito de matriz positivo para os quatro agrotóxicos. Já o extrato do mel é constituído basicamente por carboidratos livres (açúcar invertido), sendo observado um efeito de matriz negativo. Logo os extratos de batata e mel estão em quadrantes diferentes (Figura 5.1).

Extratos de leite (4) proporcionaram aumento da resposta cromatográfica para os quatro agrotóxicos (Tabela 5.2). Estes extratos apresentam em sua composição coextrativos lipofílicos de elevada temperatura de ebulição, como os lipídeos. Entretanto, estes compostos não impediram a adsorção dos agrotóxicos como os constituintes químicos do extrato de tomate (9). Mesmo apresentando um efeito positivo nas respostas para os quatro agrotóxicos a ACP agrupou esse extrato junto com os extratos de solo, maçã e água que têm efeito negativo. Provavelmente, este agrupamento foi devido à semelhança dos efeitos causados por estas matrizes na resposta do clorpirifós.

Os dados obtidos na Tabela 5.2 também foram utilizados para a análise hierárquica de agrupamentos (AHA) como pode ser observado na Figura 5.2.

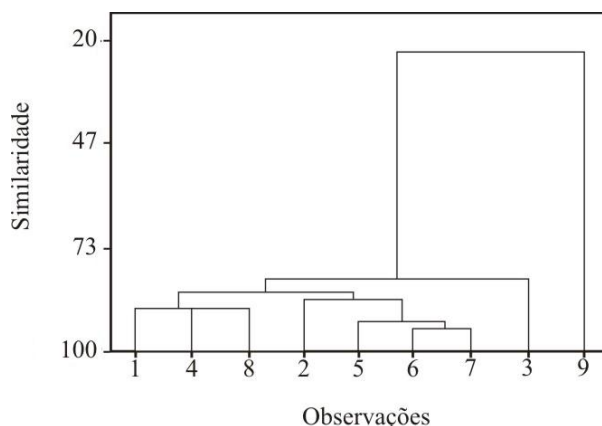


Figura 5.2. Dendrograma construído com os dados autoescalados da variação da resposta dos agrotóxicos após saturação do CG. A identificação das amostras enumeradas de 1 a 9 estão na Tabela 5.1.

A análise de agrupamento hierárquico permitiu confirmar os resultados obtidos pela análise de componentes principais, e também visualizar os agrupamentos que não ficaram evidentes (Figura 5.2). Por exemplo, os extratos das amostras 1, 4 e 8 (alcatra, leite e batata) apresentaram o mesmo índice de similaridade, embora na análise do ACP estas se apresentavam em quadrantes diferentes. Esses extratos apresentaram efeito de matriz positivo inferior a 45% para os quatro agrotóxicos. A separação do extrato de tomate (9) das demais confirma o alto efeito de matriz introduzido pelos constituintes químicos do tomate. Também é comprovado que extratos de amostras que reduzem a resposta cromatográfica tendem a se agrupar (2, 5, 6 e 7).

5.3.2. Curvas analíticas

5.3.2.1. Curvas analíticas preparadas em solvente

Para uma análise minuciosa do efeito de matriz, curvas analíticas foram construídas a partir de soluções-padrão dos agrotóxicos, em acetonitrila, nas concentrações de 5; 10, 20; 50; 100; 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estas soluções foram analisadas em nove dias diferentes para verificar a variação da resposta do CG-DCE com o uso do aparelho. Na Figura 5.3 são apresentados os

coeficientes de variação obtidos para cada concentração dos quatro agrotóxicos analisados.

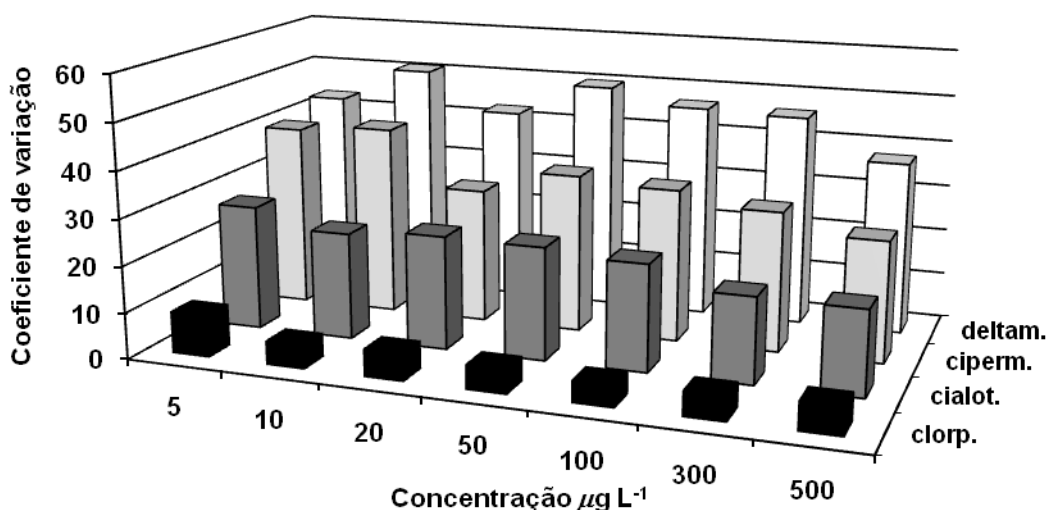


Figura 5.3. Coeficientes de variação das áreas (agrotóxico/padrão interno) dos agrotóxicos clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, analisados em nove dias diferentes, nas concentrações 5; 20; 50; 100; 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Os coeficientes de variação foram em média 6, 22, 33 e 45% para os agrotóxicos clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, respectivamente. Vale destacar que quanto maior é o tempo de retenção dos agrotóxicos maior é o coeficiente de variação.

5.3.2.2. Curvas analíticas preparadas em extratos das matrizes

Curvas analíticas foram construídas para avaliar o efeito dos coextrativos na resposta dos agrotóxicos. Para isso, soluções-padrão preparadas em solvente e em extrato de matriz foram analisadas na faixa de concentração de 5 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Na comparação entre as duas curvas analíticas (solvente e extrato de matriz), quando somente o coeficiente angular varia os componentes da matriz contribuem para introduzir nos resultados um erro sistemático proporcional. Quando apenas o coeficiente linear varia, significa que existe um erro sistemático constante.¹⁵

Para os quatro agrotóxicos analisados, observou-se que as curvas analíticas diferenciam tanto pelo coeficiente angular quanto linear. Isso pode ser verificado na Tabela 5.3, em que são apresentados a razão entre os coeficientes angulares (RCA) e lineares (RCL) das curvas analíticas obtidas em extratos da matriz e em solvente.

Tabela 5.3. Razão entre os coeficientes angulares (RCA) e lineares (RCL) das curvas analíticas obtidas em extratos da matriz e em solvente puro

Amostra	Clorpirifós		λ -Cialotrina		Cipermetrina		Deltametrina	
	RCA	RCL	RCA	RCL	RCA	RCL	RCA	RCL
Água	1,0	1,0	1,1	0,9	1,0	2,5	1,0	0,9
Alcatra	1,2	1,2	1,3	1,5	1,6	2,7	2,2	1,1
Batata	1,3	1,2	1,4	1,1	1,6	1,4	2,5	0,1
Fígado	1,3	1,7	1,5	1,4	2,1	3,4	4,0	1,9
Leite	1,2	1,1	1,3	2,3	1,7	2,2	2,4	2,3
Maçã	1,0	1,4	0,9	1,3	0,8	0,3	0,8	0,7
Mel	1,1	0,9	1,4	1,7	2,0	0,9	3,0	1,7
Tomate	1,3	1,0	1,5	1,4	2,0	2,4	2,8	2,9
Solo	1,0	1,1	0,9	1,7	0,9	0,0	0,9	-0,4

A razão entre os coeficientes angulares (extrato da matriz e solvente) indicou o erro associado ao efeito de matriz para cada agrotóxico. Quando a razão foi superior a 1,0 o efeito de matriz foi positivo enquanto que valor inferior a 1,0 indicou efeito de matriz negativo. Para concentrações mais altas dos agrotóxicos ($500 \mu\text{g L}^{-1}$), a porcentagem de variação da resposta de cada agrotóxico foi estimada pelos coeficientes angulares $[(RCA - 1) \times 100]$. Por exemplo, para o clorpirifós a variação da resposta foi de 0, 18, 30, 25, 20, 0, 10, 27 e 0% na presença dos extratos das matrizes água, alcatra, batata, fígado, leite, maçã, mel, tomate e solo, respectivamente.

Esses mesmos resultados podem ser evidenciados na Figura 5.4, em que foi determinada a porcentagem de variação da resposta cromatográfica para os quatro agrotóxicos em extratos das nove matrizes $[\% = (\bar{A}_{\text{matriz}} - \bar{A}_{\text{solvente}}) / \bar{A}_{\text{solvente}} \times 100]$.

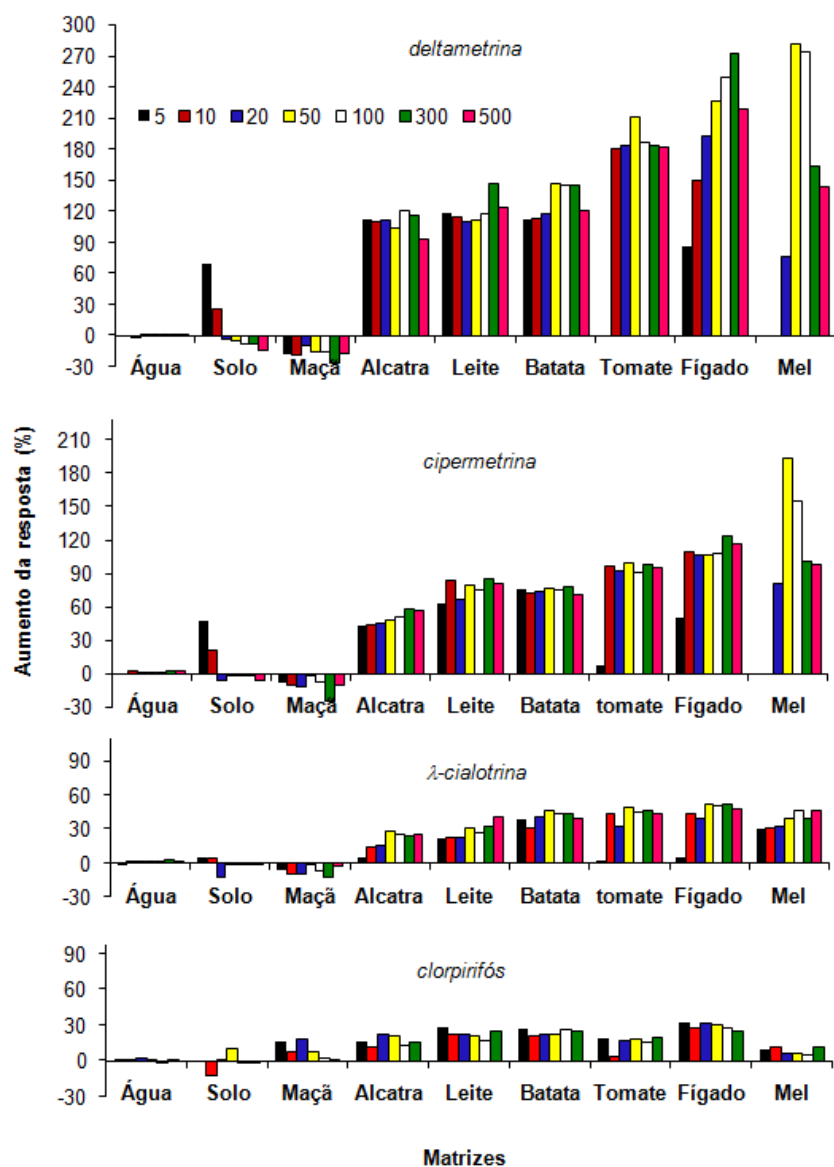


Figura 5.4. Porcentagem de variação da resposta cromatográfica dos agrotóxicos clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina quando preparados em extratos (tomate, leite, maçã, mel, solo, batata, fígado, alcatra e água) em relação às preparadas em solvente puro nas concentrações de 5, 10, 20, 50, 100, 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Observa-se na Figura 5.4 o baixo efeito de matriz (estimado pela razão do coeficiente angular (RCA), introduzido pelos componentes dos extratos de água e solo. Resultados semelhantes foram observados quando saturou-se o CG com esses extratos (Tabela 5.2).

Para os piretroides, os constituintes químicos do extrato da maçã promoveram uma redução da resposta cromatográfica, diferente do que

ocorreu com o clorpirifós que apresentou efeito de matriz positivo. Esse comportamento diferenciado das respostas dos agrotóxicos na presença dos constituintes da maçã dificulta o uso de analitos protetores bem como o uso de padrão interno como forma de minimizar os erros que ocorrem nas análises cromatográficas.

Segundo Hajslová et al.² o efeito de matriz é maior para as baixas concentrações de agrotóxicos. Entretanto, resultados obtidos neste trabalho e, principalmente, nas análises de deltametrina em extrato de fígado (Figura 5.4), o efeito de matriz aumentou com a concentração dos agrotóxicos.

Para deltametrina e cipermetrina não foi possível determinar a área nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparadas em acetonitrila e extratos de mel, devido a baixa detectabilidade do aparelho nessas condições. Ambas as curvas analíticas foram obtidas após injeções sucessivas de extratos de mel no CG-DCE. Embora a saturação do CG com extratos de mel tenda diminuir a resposta dos agrotóxicos (Tabela 5.2), as curvas analíticas nesse extrato proporcionaram maior resposta cromatográfica quando comparada em solvente.

De forma geral, considerando o efeito de matriz como uma competição entre os agrotóxicos e componentes da matriz por sítios ativos, os quais são introduzidos simultaneamente no sistema de injeção, a ordem crescente de efeito de matriz, estimado pelo RCA, para os piretroides foi água < solo < maçã < alcatra < leite < batata < tomate < mel < fígado. Esta ordem é ligeiramente diferente dos dados da tabela 5.2 porque leva em consideração a contribuição total dos erros introduzidos pelo efeito de matriz na quantificação. Também foi observado que para todas as amostras a ordem crescente de efeito de matriz foi clorpirifós < cialotrina < cipermetrina < deltametrina.

Não foi observado em nenhum cromatograma sinais de degradação dos agrotóxicos promovidos por componentes das matrizes. Entretanto, coextrativos do leite promoveram instabilidade da linha de base, apresentando muitos ruídos.

5.4. CONCLUSÃO

As análises quimiométricas (ACP e AHA) mostraram-se ferramentas úteis no estudo de efeito de matriz para os quatro agrotóxicos. Quatro grupos foram evidenciados na ACP, sendo o primeiro formado por extratos que proporcionaram efeito de matriz positivo (batata, alcatra e leite). O segundo grupo proporcionou efeito de matriz negativo (água, solo, maçã e mel), o terceiro e quarto grupos foram formados por extratos de fígado e tomate, respectivamente. Esses dois extratos formaram grupos unitários, pois o fígado e o tomate aumentaram consideravelmente a resposta cromatográfica do clorpirifós (acima de 25%) e piretroides (de 100 a 300%), respectivamente, após a saturação do sistema cromatográfico.

Observou-se também que as respostas cromatográficas dos agrotóxicos preparados em acetonitrila, apresentaram coeficientes de variação de 6 a 45% quando analisados em dias diferentes. A dispersão dos resultados aumentou com o tempo de retenção dos agrotóxicos.

Comparando-se as curvas analíticas em acetonitrila e extratos das matrizes, a ordem crescente de efeito da matriz para os piretroides foi água < solo < maçã < alcatra < leite < batata < tomate < fígado < mel. Também foi observado para todas as matrizes que a variação da resposta cromatográfica dos agrotóxicos foi clorpirifós < λ -cialotrina < cipermetrina < deltametrina.

5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Renévan der Hoff, G.; Van Zoonen, P; *J. Chromatog., A* **1999**, 843, 301.
2. Hajslová, J.; Holadova, K.; Kocourek, V.; Poustka, J.; Godula, M.; Cuhra, P.; Kempny, M.; *J. Chromatogr., A* **1998**, 800, 283.
3. Erney, D. R.; Gillespie, A. M.; Gilvydis, D. M.; *J. Chromatogr., A* **1993**, 638, 57.
4. Sanchez-Brunete, C.; Albero, B.; Martín. G.; Tadeo, J. L.; *Anal. Sci.* **2005**, 21, 129.
5. Schenck, F. J.; Lehotay, S. J.; *J. Chromatogr., A* **2000**, 868, 51.
6. Hajslová, J.; Zrostlikova, J.; *J. Chromatogr., A* **2003**, 1000, 181.
7. Zrostikova, J.; Hajslova, J.; Godula, M.; Mastovska, E.; *J. Chromatogr., A* **2001**, 937, 73.
8. Pereira, A. S.; Neto, F. R. A; *Quím. Nova* **2000**, 23, 370.
9. Godula, M.; Hajslová, J.; Mastouska, K.; Krivanková, J.; *J. Sep. Sci.* **2001**, 24, 355.
10. Rantakokko, P.; Yritys, M.; Vartiainen, T.; *J. Chromatogr., A* **2004**, 1028, 179.
11. Anastassiades, M.; Mastovská, K; Lehotay, S. J.; *J. Chromatogr., A* **2003**, 1015, 163.
12. Erney, D. R.; Poole, C. F.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1993**, 16, 501.
13. Kirchner, M.; Huskova, R.; Matisova, E.; Mocak, J.; *J. Chromatogr., A* **2008**, 1186, 271.
14. Gonzáles, F. J. E.; Torres, M. E. H.; López, E. A.; Cuadros-Rodriguez, L.; Vidal, J. L. M.; *J. Chromatogr., A* **2002**, 996, 155.
15. Cuadros-Rodriguez, L.; García-Campana, A. M.; Almansa-López, E.; Egea-Gonzáles, F. J.; Cano, M. L. C.; Frenich, A. G.; Marínez-Vidal, J. L., *Anal. Chim. Acta* **2003**, 478, 281
16. Lehotay, S. J.; Eller, K. I.; *J. AOAC Int.* **1995**, 78, 821.
17. Menkissoglu-Spiroudi, U.; Fotopoulou, A.; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2004**, 84, 15.
18. Erney, D. R.; Pawlowski, T. M.; Poole, C. F.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1997**, 20, 375.
19. Jimenez, J.; Bernal, J.; Del Nozal, M.; Toribio, L.; Arias, E.; *J. Chromatogr., A* **2001**, 919, 147.

20. Jimenez, J. J.; Bernal, J. L.; del Nozal, M. J.; Martin, M. T.; Mayo, R.; *J. Chromatogr., A* **2008**, 1187, 40.
21. Rossia, S.; Dalperoa, A. P.; Ghinia, S.; Colombob, R.; Sabatinib, A. G.; Girottia, S.; *J. Chromatogr., A* **2001**, 905, 223.
22. Barker, S. A.; *J. Chromatogr., A* **2000**, 880, 63
23. Barker, S. A.; *J. Chromatogr., A* **2000**, 885, 115.
24. Goulart, S. M.; Queiroz, M. E. L. R.; Neves, A. A.; *Talanta*, **75**, 1320-1323.
25. Pinho, G. P.; A. A. Neves, M. E. L. R. Queiroz, Silvério, F. O. *Food Chem.* 2009. (aceito para publicação)
26. Gonzalez-Rodriguez, R. M.; Rial-Otero, R.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gandara, J.; *Food Chem.* **2008**, 107, 1342.
27. Przbyski, C.; Hommet, F. *J. Chromatogr., A* **2008**, 1201, 78.
28. Mastovska, K.; Lehotay, S. J.; Anastassiades M.; *Anal. Chem.* **2005**, 77, 8129.
29. Ferreira, M. M. C.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O. *Quím. Nova*, **1999**, 22, 724.
30. Vieira, H. P., Neves, A. A., & Queiroz, M. E. L. R. *Quím. Nova* **2007**, 30, 535.
31. Pinho, G. P.; Neves, A. A., Queiroz, M. E. L. R., Starling, M. A. V. M., Silvério, F. O. *Anal. Sci.* **2009**. (submetido para publicação)
32. Dardengo, R. P. Análise multirresíduo de inseticidas em batata (*Solanum tuberosum* L.). *Dissertação de Mestrado (Agroquímica)*, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, **2007**.
33. Silva, É. P. Validação de método de extração e análise multirresíduo de agrotóxicos em carne bovina por cromatografia gasosa. *Dissertação de Mestrado (Agroquímica)*, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, **2008**.
34. Pussente, I. C. Determinação de resíduos de agrotóxicos em maçã por cromatografia gasosa. *Dissertação de Mestrado (Agroquímica)*, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, **2008**.
35. TACO –Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, versão 2 – 2^a ed., **2006**. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste trabalho levaram à melhor compreensão do efeito de matriz na quantificação dos agrotóxicos clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em análises por CG-DCE. Avaliou-se a adsorção de alguns destes agrotóxicos no injetor e na coluna cromatográfica e a influência dos componentes de nove matrizes na resposta cromatográfica destes agrotóxicos. Algumas conclusões podem ser destacadas: no Capítulo 2 é relatado que o efeito de matriz na quantificação dos quatro agrotóxicos está relacionado com o tempo de retenção destes nas análises cromatográficas. Além disso, os constituintes químicos do tomate aumentam consideravelmente a resposta dos piretroides, mesmo com a utilização do padrão interno para quantificação. Foi possível observar (capítulo 3) que maiores temperaturas do injetor (310 °C) e menores taxas de aquecimento da coluna cromatográfica (10 °C min⁻¹) diminuem a adsorção dos agrotóxicos no CG. Também foi verificado que agrotóxicos com maiores tempos de retenção (deltametrina) atuam como analitos protetor na adsorção de agrotóxicos de menores tempos de retenção (clorpirifós).

A otimização e validação da técnica ELL-PBT para análises dos quatro agrotóxicos em amostras de mel, apresentada no capítulo 4, permitiu a obtenção de extratos limpos e com eficiência de extração dos agrotóxicos superior a 84%. O método apresentou desvio-padrão inferior a 10% e limites de detecção e quantificação de $0,016 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,032 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, para os quatro agrotóxicos. Com a aplicação do método foi possível determinar resíduos de clopirifós e λ -cialotrina em amostras de mel com valores abaixo do LMR destes agrotóxicos em amostras de alimentos.

Além das amostras de mel e tomate, a técnica de ELL-PBT e ESL-PBT também foi utilizada para obter extratos de alcatra, fígado, maçã, leite, batata, água e solo para estudos de efeito de matriz. Os resultados apresentados no capítulo 5 mostraram que após a saturação do sistema cromatográfico com extratos das matrizes, componentes do mel, água, solo e maçã reduzem as respostas dos piretroides (0 a -20%) enquanto que extratos de alcatra, fígado, leite, batata e tomate aumentam a resposta cromatográfica destes agrotóxicos (7 a 302%).