

GEVANY PAULINO DE PINHO

**EXTRAÇÃO DE PESTICIDAS EM AMOSTRAS DE TOMATE PELAS
TÉCNICAS: EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO E PURIFICAÇÃO EM BAIXA
TEMPERATURA (ESL-PBT) E DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA
(DMFS) PARA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

GEVANY PAULINO DE PINHO

**EXTRAÇÃO DE PESTICIDAS EM AMOSTRAS DE TOMATE PELAS
TÉCNICAS: EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO E PURIFICAÇÃO EM BAIXA
TEMPERATURA (ESL-PBT) E DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA
(DMFS) PARA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA**

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

APROVADA: 16 de fevereiro de 2007.

Prof. Fernando Barboza Egreja Filho

Prof. Carlos Roberto Bellato

Prof^a. Maria Eliana L. R. de Queiroz
(Co-orientadora)

Prof. César Reis
(Co-orientador)

Prof. Antônio Augusto Neves
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a 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.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Antônio Augusto Neves, por sua orientação e atenção em todos os momentos e pela confiança demonstrada ao longo deste trabalho.

À professora Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz pelo carinho e apoio durante todo o desenvolvimento do trabalho de pesquisa.

Aos colegas de laboratório de Química Analítica (LAQUA) pela paciência demonstrada, e que direta ou indiretamente, contribuíram de forma positiva para a realização deste trabalho.

À minha família que apesar de distante sempre esteve presente em todos os momentos.

E ao Flaviano, que sempre procurou entender a minha necessidade de dedicação ao mestrado, e contribuiu de forma significativa com a sua experiência para a realização deste trabalho com paciência, carinho e atenção.

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.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1	14
1.1. MATERIAIS E MÉTODOS	14
1.1.1. Preparo de soluções padrão de pesticidas	14
1.1.2. Preparo de amostras de tomates hidropônicos fortificadas	15
1.1.3. Otimização da técnica de extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT)	15
1.1.3.1. Planejamento de misturas.....	15
1.1.3.2. Otimizações univariadas	18
1.1.3.2.1. Efeito do sistema de agitação da ESL-PBT na porcentagem de extração dos pesticidas em tomate.....	19
1.1.3.2.2. Efeito da força iônica na porcentagem de extração dos pesticidas em tomate pela ESL-PBT	19
1.1.3.2.3. Avaliação do efeito de matriz na porcentagem de recuperação dos pesticidas.....	19

1.1.3.2.3.1. Superposição de matriz	20
1.1.3.2.3.2. Variação da resposta do detector	20
1.1.3.2.4. Eficiência de adsorventes no <i>clean up</i> dos extratos obtidos na ESL-PBT de amostras de tomate	20
1.1.4. Análise cromatográfica.....	21
1.1.4.1. Curva analítica (método da padronização interna)	22
1.1.4.2. Método otimizado da ESL-PBT e análise por cromatografia gasosa de quatro pesticidas em tomate.....	22
1.1.5. Validação do método analítico	22
1.1.5.1. Seletividade	23
1.1.5.2. Limite de detecção e quantificação	23
1.1.5.3. Linearidade de resposta do detector.....	23
1.1.5.4. Precisão	24
1.1.5.5. Exatidão	24
1.1.6. Determinação dos pesticidas em amostras reais de tomates	24
1.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
1.2.1. Análise cromatográfica.....	26
1.2.2. Otimização da técnica de extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT)	28
1.2.2.1. Planejamento de misturas.....	28
1.2.2.2. Efeito do sistema de agitação da ESL-PBT na porcentagem de extração dos pesticidas em tomate.....	35
1.2.2.3. Efeito da força iônica na porcentagem de extração dos pesticidas em amostras de tomate	37
1.2.2.4. Avaliação do efeito de matriz na porcentagem de recuperação dos pesticidas.....	38
1.2.2.5. Eficiência de adsorventes no <i>clean up</i> dos extratos obtidos na ESL-PBT de amostras de tomate	44
1.2.3. Metodologia otimizada	48
1.2.4. Validação do método analítico	49
1.2.4.1. Seletividade	49
1.2.4.2. Limite de detecção e limite de quantificação.....	50
1.2.4.3. Curvas analíticas e linearidade de resposta do detector	52
1.2.4.4. Precisão	53
1.2.4.5. Exatidão	54

1.2.5. Determinação dos pesticidas clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em amostras comerciais de tomate.....	56
CAPÍTULO 2.....	57
2.1. MATERIAIS E MÉTODOS	57
2.1.1. Preparo de soluções padrão de pesticidas	57
2.1.2. Preparo de amostras de tomates hidropônicos fortificados	58
2.1.3. Otimização da técnica de extração Dispersão da Matriz em Fase Sólida (DMFS)	58
2.1.3.1. Extração dos pesticidas em tomate por DMFS – Técnica geral.....	58
2.1.3.2. Avaliação do adsorvente e eluente para a técnica de extração DMFS.....	59
2.1.3.3. Planejamento Fatorial	60
2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
2.2.1. Avaliação de adsorventes e eluentes para a técnica de extração DMFS	62
2.2.2. Planejamento Fatorial	68
2.2.3. Metodologia otimizada	72
2.3. Comparação das técnicas de ESL-PBT e DMFS.....	73
CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C-18	Octadecil
C-8	Octil
CG	Cromatografia gasosa
CV	Coeficiente de variação
DCE	Detector por captura de elétrons
DIC	Detector por ionização em chama
DMFS	Dispersão da matriz em fase sólida
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

RESUMO

PINHO, Gevany Paulino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007. **Extração de pesticidas em amostras de tomate pelas técnicas: extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) e dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) para análise por cromatografia gasosa.** Orientador: Antônio Augusto Neves. Co-orientadores: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e César Reis.

Procurou-se neste trabalho otimizar e validar a técnica de extração sólido líquido e purificação a baixa temperatura (ESL-PBT) e otimizar a técnica dispersão de matriz em fase sólida dos pesticidas: clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em amostras de tomate. A composição da mistura extratora utilizada na ESL-PBT foi otimizada realizando um planejamento experimental de misturas de três componentes, com o objetivo de avaliar a taxa de recuperação dos princípios ativos a partir das modificações da polaridade da mistura extratora. Essas misturas de solventes, em fase única, foram adicionadas às amostras de tomate previamente fortificadas, homogeneizadas e deixadas no freezer por 12 horas. Depois de separadas as fases pelo congelamento da fase aquosa, os líquidos sobrenadante foram separados e submetidos à análise cromatográfica. Foi avaliado também o *clean up* dos extratos utilizando os adsorventes florissil, sílica, C-18 e carvão ativado. A quantificação dos pesticidas foi feita em cromatógrafo a gás com detector por

captura de elétrons, usando como padrão interno a bifentrina. A mistura extratora, acetonitrila (80%), acetato de etila (15%) e água (5%), proporcionou a melhor taxa de recuperação para todos os pesticidas (acima de 80%), e a análise da superfície de resposta indicou que a extração dos pesticidas é favorecida pela adição de acetato de etila, principalmente para os piretróides cipermetrina e deltametrina. Estes pesticidas também são os que apresentaram maior efeito de matriz na análise cromatográfica. Quando foram preparadas as soluções padrões no extrato da matriz (branco), a taxa de recuperação de todos os pesticidas diminuiu para cerca de 70%. As otimizações univariadas mostraram: que a homogeneização da amostra de tomate com a mistura extratora deve ser realizada em banho ultra-sônico por 1 minuto; que o aumento da força iônica do meio não interfere na extração dos pesticidas e que o *clean up* dos extratos remove significativamente os pigmentos quando 10 mg de carvão ativo são adicionados à mistura extratora, obtendo uma taxa de recuperação dos piretróides acima de 70%. Entretanto, esta etapa de *clean up* é desfavorável para o clorpirifós. A técnica otimizada foi validada, determinando as principais figuras de mérito, tais como: seletividade, limites de detecção e de quantificação, linearidade, precisão e exatidão. Os resultados indicam que o método de ESL-PBT é eficiente para a extração dos quatro pesticidas em amostras de tomate, possibilitando a determinação destes compostos em níveis menores que os limites máximos de resíduos estabelecidos pela ANVISA. Na técnica dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) pequena quantidade de amostra de tomate foi triturada com um adsorvente, sendo a mistura transferida para uma coluna e eluída com um solvente apropriado. Foram avaliados os adsorventes C-8, C-18, florissil e sílica como dispersantes da amostra, e o acetato de etila e a mistura hexano: acetona (9:1) como os eluentes. O florissil combinado com o acetato de etila proporcionou as melhores porcentagens de extração e pureza satisfatória dos extratos. Assim, foi executado um planejamento fatorial 2^3 para avaliar quantitativamente o efeito de três fatores: proporção de adsorvente / amostra (1:1 e 2:1), co-coluna (sem e com co-coluna) e banho ultra-sônico (sem e com banho ultra-sônico) na porcentagem de extração dos pesticidas. Pelos resultados, a presença da co-coluna apresentou um efeito negativo na extração do clorpirifós, embora qualitativamente proporcionasse extratos mais limpos. A utilização do banho ultra-sônico aumentou significativamente a extração dos pesticidas clorpirifós,

λ -cialotrina e cipermetrina. Observou-se efeito de interação apenas entre os fatores proporção de adsorvente: amostra e auxílio do banho ultra-sônico, em que a porcentagem de extração do clorpirifós e cipermetrina aumentou significativamente em 6,62% e 8,08%, respectivamente. Comparando-se as técnicas de extração ESL-PBT e DMFS, ambas apresentaram taxa de recuperação semelhante para os pesticidas, exceto para o clorpirifós em que a ESL-PBT apresentou resultado mais satisfatório. Além disso, os extratos obtidos na ESL-PBT são menos susceptíveis à presença de interferentes e a técnica apresenta menor custo.

ABSTRACT

PINHO, Gevany Paulino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february 2007. **Pesticide extraction in tomato samples by techniques: liquid–solid extraction and low-temperature purification (LSE-LTP) and matrix solid-phase dispersion (MSPD) and analysis by gas chromatography.** Adviser: Antônio Augusto Neves. Co-advisers: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz and César Reis.

The objective of this work was to optimize and validate the liquid–solid extraction and low-temperature purification (LSE-LTP) methods and optimize the matrix solid-phase dispersion (MSPD) method for the extraction of the pesticides Chlorpyrifos, λ -cyhalothrin, cypermethrin and deltamethrin in tomato samples. The composition of the extractive mixture used in LSE-LTP was optimized by carrying out an experimental planning of three-component mixtures to evaluate the recovery rate for the active principles starting from the changes in the polarity of the extractive mixture. These one-phase solvent mixtures were added to the tomato samples, homogenized and left in a freezer by 12 hours. After separating the phases by freezing the aqueous phase, the supernatant liquid was removed and chromatographically analyzed. The cleanup of these extracts was also evaluated using the adsorbents Florisil, silica, C-18 and activated charcoal. Pesticide quantification was carried out in a gas chromatograph with electron capture detector, using bifentrin as internal

standard. The extractive mixture, acetonitrile (80%), ethyl acetate (15%) and water (5%), provided the highest recovery rate for all the pesticides (above 80%), and the surface response analysis indicated that pesticide extraction is improved by the addition of ethyl acetate, particularly for the pyrethroids cypermethrin and deltamethrin. These pesticides have also shown larger matrix effect on the chromatographic analysis. When the standard solutions were prepared in blank matrix extract, the recovery rate of all the pesticides decreased in approximately 70%. The univariate optimizations showed that the homogenization of the tomato sample with the extractive mixture should be performed in ultrasonic bath for 1 minute; that the increase of the medium ionic force does not interfere in pesticide extraction; and that extract cleaning up significantly removes pigments when 10 mg of active charcoal is added to the extractive mixture, obtaining pyrethroid recovery rate above 70%. However, this cleanup stage was unsuitable for Chlorpyrifos. The optimized technique was validated by determining the main parameters such as selectivity, limits of detection, quantification, linearity, precision and accuracy. The results indicate that the LSE-LTP method is efficient for extracting the four pesticides in tomato samples, allowing the determination of these compounds at levels lower than the established as maximum residue limits by ANVISA. In the matrix solid phase dispersion technique, a small amount of tomato sample was crushed with an adsorbent, then the mixture was transferred to a column and eluted with appropriate solvent. The adsorbents C-8, C-18, Florisil and silica were evaluated as dispersants of the sample, and ethyl acetate and the mixture hexane:acetone (9:1) as eluents. Florisil in combination with ethyl acetate gave the best percentages of extraction and satisfactory extract purity. Thus, a 2³ factorial arrangement was carried out to evaluate quantitatively the effect of three factors: adsorbent proportion/sample (1:1 and 2:1), co-column (with and without co-column) and ultrasonic bath (with and without ultrasonic bath) on the percentage of pesticide extraction. The use of co-column caused a negative effect on Chlorpyrifos extraction, although it provided qualitatively much cleaner chromatograms. Ultrasonic bath increased significantly the extraction of the pesticides Chlorpyrifos, λ -cyhalothrin, and cypermethrin, not interfering in the extraction of deltamethrin. There was interaction effect only between the factors adsorbent proportion: sample and ultrasonic bath, with the percentage of extraction of Chlorpyrifos and cypermethrin increasing significantly by 6.62%

and 8.08% respectively. The comparison between the LSE-LTP and MSPD techniques showed that both presented similar recovery rate for the pesticides, except for the Chlorpyrifos that had better result with LSE-LTP. In addition, the extracts obtained by LSE-LTP are less susceptible to the presence of interferences and it is a less costly technique.

INTRODUÇÃO

Pesticidas e o meio ambiente

A utilização de produtos químicos para controlar pragas, doenças e ervas daninhas possibilitaram ao ser humano aumentar a produção de alimentos em quantidade e qualidade. Estes produtos denominados pesticidas, praguicidas, agroquímicos, etc, foram por muito tempo utilizado de forma indiscriminada, até surgirem algumas preocupações com os impactos ambientais causados pelo seu uso inadequado (BARBOSA, 2004). Como por exemplo, o acúmulo de agrotóxicos no solo levando à contaminação de lençóis freáticos e de águas superficiais, tornando-as inadequadas para o consumo humano (RIBEIRO et al, 2007).

Além disso, vale destacar que os pesticidas com características mais lipofílicas podem se acumular nos tecidos adiposos de animais, contaminando toda a cadeia alimentar, (D´AMATO et al, 2002), interferindo diretamente na saúde humana, e na sobrevivência de alguns animais, através de desequilíbrios ecológicos. Isto tem gerado uma preocupação e existe uma tendência mundial de se empregar todos os recursos para se encontrar compostos mais específicos, e que sejam menos tóxicos e persistentes no ambiente (SANTOS, 2002).

Na busca de se eliminar estes problemas, os ambientalistas assumiram a defesa de uma agricultura sem a utilização de pesticidas. Entretanto, sabe-se que culturas livres de pesticidas geram colheitas com menor rendimento, o que conduz a maiores áreas de cultivo para se obter a mesma quantidade de alimentos, colocando em riscos novos ecossistemas (SANTOS, 2002). Por isso, os agroquímicos sintéticos continuam sendo as alternativas mais eficazes no controle de pragas.

Neste sentido, o monitoramento detalhado dos resíduos de agrotóxicos no meio ambiente é de fundamental importância, principalmente para assegurar a qualidade dos alimentos que chegam até o consumidor.

No Brasil, o controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos começou a se desenvolver isoladamente a partir da década de 1970, com o primeiro laboratório de análise de resíduos, trabalhando na determinação de organoclorados em leite, estendendo suas atividades também para análise de pesticidas em carne bovina, devido às exigências nas exportações. Entretanto, as dificuldades de manter um laboratório de análise de pesticidas, motivaram a criação de Encontros Nacionais de Analistas de Resíduos de Pesticidas para discutir o mau uso dos pesticidas e difundir a necessidade de se fazer a análise destes.

Em 1980, foi criado o Grupo de Análise de Resíduos de Pesticidas (GARP) que se fortaleceu transformando em uma Associação Grupo de Análise de Pesticidas (AGARP) com competência para resolver problemas de aquisições de padrão analítico puro, exigir maior qualidade dos solventes para análise de pesticidas, padronização de metodologia analítica, etc. (LARA & BATISTA, 1992).

No entanto, somente nos últimos anos, com os avanços científicos e uma política responsável permitiu uma melhor avaliação da qualidade dos alimentos consumidos em relação à presença de agrotóxicos (ANVISA, 2006).

Em 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA), implantou um Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) com a participação de vários estados brasileiros e laboratórios de análise de resíduos de agrotóxicos.

A criação deste programa tem como objetivo o monitoramento dos principais pesticidas encontrados em frutas, verduras, hortaliças e outros alimentos. Dentro do quadro de alimentos investigados, destaca-se o tomate

por ser um fruto muito consumido no Brasil, e por exigir em sua cultura uma ampla variedade de pesticidas.

Cultura do tomate

Hortaliça de maior comercialização no país e muito apreciada pelo seu elevado valor nutritivo, o tomate é rico em vitamina A e C, fosfato e potássio, além de apresentar cerca de 95% de água em sua composição (SARAIVA, 2004).

O cultivo convencional de tomate exige grande quantidade e variedade de adubos químicos e de defensivos agrícolas (inseticidas, acaricidas, fungicidas, etc), sendo que este último representa aproximadamente 17% do custo da produção (PENTEADO, 2004). Conseqüentemente, o uso dos pesticidas no tomateiro pode provocar contaminações do solo, águas e dos próprios frutos. Além disso, pode provocar desequilíbrios ecológicos, por eliminar ou diminuir a eficiência dos inimigos naturais das pragas, podendo resultar em surgimento de novas pragas, mais resistentes e persistentes para a cultura (SARAIVA, 2004).

A contaminação dos frutos de tomates se dá predominantemente por resíduos de agrotóxicos que podem persistir como camadas superficiais depositadas no fruto. Alguns pesticidas podem penetrar na superfície do fruto, dissolver-se e mover-se para o interior, incorporando à polpa. FREITAS (1992) afirma que a lavagem convencional de um alimento (com água de torneira) não provoca redução significativa nos níveis residuais dos frutos. Entretanto, lavar o tomate com solução de NaCl a 10% reduz significativamente pesticidas do fruto (cerca de 85%). Esta redução é também observada quando a pele do tomate é removida (ABOU-ARAB, 1999).

A presença de pesticidas em tomates é mais freqüente por causa das sucessivas aplicações semanais, o que aumenta a quantidade de resíduos nos frutos. Outro fator agravante é a baixa degradação de alguns pesticidas, como por exemplo, a presença de resíduos de piretróides em tomate descrito por CABRAS et al (1985) e por FREITAS (1992) em relação ao organofosforado metamidofós.

A persistência dos pesticidas no fruto do tomate é fortemente influenciada pela umidade, temperatura, características físico-químicas do

pesticida, etc. Para minimizar impactos ambientais causados pela aplicação de pesticidas, deve haver orientação técnica e agrônômica durante a aplicação, com relação à dosagem necessária, à época e às condições climáticas favoráveis (chuvas, velocidade e direção do vento, etc.) para evitar a contaminação do alimento.

Piretróides

Desde a introdução dos piretróides no mercado dos agrotóxicos, em 1973, estes análogos das piretrinas, têm sido amplamente usados como inseticidas na agricultura, na horticultura, em tratamentos domissanitários, etc. Conseqüentemente, os piretróides podem ser encontrados como resíduos em solos, águas, alimentos, etc. (HIRATA, 1995; KASCHERES & CUNHA, 1989).

Os piretróides são muito utilizados, pois são bastante eficientes no controle das pragas, estáveis e pouco tóxicos ao meio ambiente quando comparados às piretrinas, constituinte químico do piretro que possui atividade inseticida (SODERLUND et al, 2002). Normalmente, a aplicação dos piretróides é realizada na parte foliar das culturas, mas também podem ser utilizados em produtos ensacados e armazenados (ANVISA, 2006). Dentre os piretróides mais utilizados destaca-se a deltametrina, cipermetrina e a λ -cialotrina, cujas fórmulas estruturais estão representadas na Figura 1.

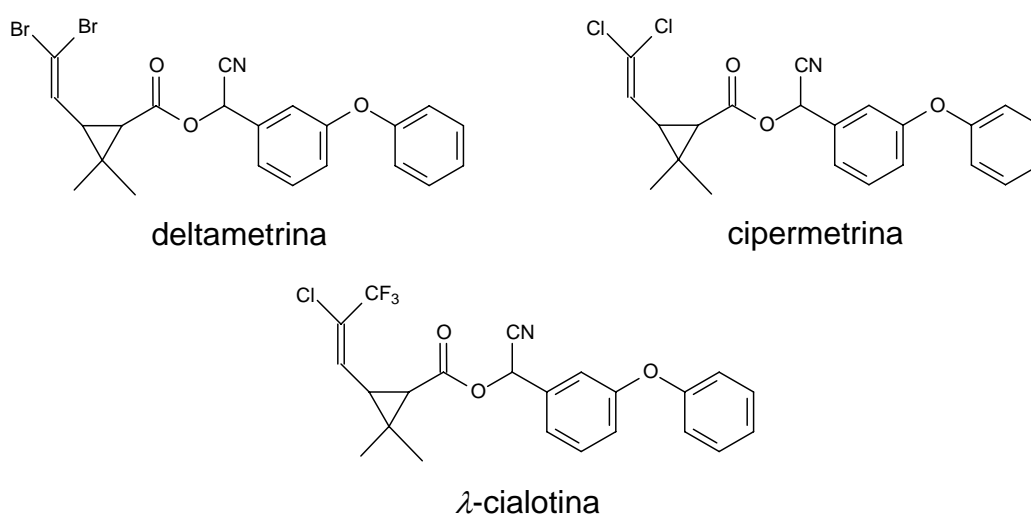


Figura 1 – Principais piretróides utilizados em culturas de tomate.

As propriedades físicas destes pesticidas bem como o limite máximo de resíduo (LMR) estabelecido pela ANVISA estão na Tabela 1.

Tabela 1 – Propriedades físicas dos piretróides deltametrina, cipermetrina e λ -cialotrina e os LMR em tomate

Piretróides	massa molar / g mol ⁻¹	solubilidade em água/ mg L ⁻¹ (20 °C)	LMR / mg kg ⁻¹ de tomate
deltametrina	505	0,0002	0,03
cipermetrina	416	0,004	0,1
λ -cialotrina	449,5	0,004	0,05

Na produção de tomate, a cipermetrina é recomendada para controle de insetos Tripes, já a deltametrina e a λ -cialotina são freqüentemente utilizadas como estressantes para desalojar as lagartas *Tuta Absoluta* do tomate. Os piretróides de maneira geral são utilizados também no controle dos insetos de Broca-pequena-do-fruto, Broca-grande-do-fruto, Lagartas, Grilos, etc. (SARAIVA, 2004).

Os piretróides têm ação neurotóxica atuando na transmissão do impulso nervoso. Segundo SODERLUND et al (2002) o modo de ação desta classe de inseticidas é semelhante ao dos organoclorados ciclodienos. Isto é, atuam na transmissão axônica, interferindo no fluxo normal dos íons sódios envolvidos na transmissão do impulso nervoso.

Organofosforados

Na década de 1940, os organofosforados foram introduzidos no mercado de pesticidas, sendo usado como inseticidas, acaricidas, nematicidas e fungicidas. Devido a sua alta eficácia no controle de uma ampla variedade de pragas estes compostos são os preferidos nas lavouras, possibilitando encontrar resíduos e subprodutos em níveis nocivos ao consumo humano (SILVA et al, 1999; SILVA et al, 2006).

Em relação aos agrotóxicos clorados os organofosforados são mais tóxicos (em termos de toxicidade aguda), porém proporcionam menos danos ao meio ambiente por não serem bioacumuladores (WESSELING et al, 2005).

Eles podem ser absorvidos por diversas rotas, incluindo inalação, ingestão e absorção dérmica. Atuam inibindo a ação da enzima acetilcolinesterase na transmissão dos impulsos nervosos. Estes compostos são conhecidos por induzirem ou agravarem certos problemas de saúde em seres humanos (EPA, 2006; SILVA et al, 2006). Como pode ser verificado no trabalho realizado por RUSSO et al (2002), que encontrou organofosforados em tecidos humanos de rins, fígado e tecido adiposo de pacientes saudáveis e afetados por câncer, os quais foram quantificados em níveis de ng de pesticidas por grama de tecido.

Os organofosforados representam o grupo químico de agrotóxicos formado por apenas ésteres de ácido fosfórico e outros ácidos à base de fósforo. Dentre esta classe destaca-se o clorpirifós (Figura 2), com modo de ação de contato, ingestão e fumigação.

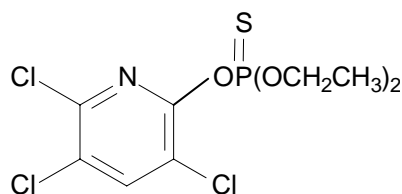


Figura 2 - Estrutura do clorpirifós.

A preocupação com a presença de clorpirifós em alimentos tem motivado a realização de vários trabalhos, como por exemplo, o estudo de clorpirifós em casca e polpa de pepino (FERST, 1991), em diversos vegetais (VIANA et al, 1996), tomates (GOBO, 2001), em alface (PENA et al, 2003). Destaca-se o estudo de CELLA (2002) que detectou clorpirifós em maçãs, acima do limite máximo de resíduo permitido para amostras comerciais.

O clorpirifós é um sólido cristalino de massa molar 350,5 g mol⁻¹, com ponto de fusão de aproximadamente 43 °C, que apresenta baixa solubilidade em água (1,4 mg L⁻¹ a 25 °C) (NRA, 2002). Em culturas de tomate, o clorpirifós é utilizado principalmente no controle das lagartas Broca-pequena-do-fruto, Broca-grande-do-fruto e lagarta-rosca (SARAIVA, 2004). O limite máximo permitido para seus resíduos no tomate para fins industriais é 0,5 mg kg⁻¹. Fato interessante, é que a ANVISA não autoriza a aplicação deste inseticida em culturas de tomate para consumo humano *in natura*.

Análises de pesticidas

Diversos métodos de análise são empregados na identificação e quantificação de pesticidas em alimentos. Em geral, exigem uma técnica de extração do analito, *clean up* dos extratos, ou pré-concentração dos compostos antes da análise.

A técnica de extração mais freqüentemente usada é a Extração Líquido-Líquido. Entretanto, é um método tedioso, de elevado custo, de difícil automação e que consome grande quantidade de solventes orgânicos (LANÇAS, 2004).

A Extração com Fluido Supercrítico (LEHOTAY, 1997) e a Extração em Fase Sólida (LANÇAS, 2004; TORRES et al, 1997) são técnicas mais rápidas, que utilizam menores quantidades de solventes orgânicos, e permitem analisar matrizes com baixa concentração dos analitos, com maior sensibilidade de detecção. Outra técnica muito divulgada em trabalhos científicos é a Extração Sólido-Líquido, porém com elevado consumo de solventes orgânicos e amostra, além da co-extração de um grande número de interferentes da matriz (NAVARRO et al, 2002).

Técnicas como Microextração em Fase Sólida (FYTIANOS et al, 2006) e Extração assistida por microonda (PAPADAKIS et al, 2006) estão sendo aprimoradas para a extração de pesticidas em alimentos. Neste cenário, a Dispersão da Matriz em Fase Sólida (DMFS) e Extração Sólido-Líquido e Purificação em Baixa temperatura (ESL-PBT) tem revelado bons resultados na extração de pesticidas em matrizes sólidas, devido à possibilidade de se realizar em um único passo a extração de pesticidas e o *clean up dos extratos*.

A cromatografia gasosa (CG) é o método de análise mais empregado devido à eficiência na separação e quantificação das espécies de interesse presentes nos extratos, utilizando detector por captura de elétrons (DCE), adequado para análise de compostos halogenados, ionização de chama (DIC) ou espectrômetro de massas (EM) (COLLINS et al, 2006). Sendo este último muito utilizado para a confirmação dos pesticidas, pois fornece informações estruturais baseada na fragmentação dos compostos.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector ultravioleta é muito útil na quantificação de pesticidas não volatilizáveis.

Análises espectrofotométricas são mais úteis para quantificação de ditiocarbamatos devido à geração de CS₂ após digestão ácida.

Dispersão da Matriz em Fase Sólida (DMFS)

Esta técnica foi desenvolvida por BARKER, em 1989, para extrair compostos de amostras sólidas e semi-sólidas, como tecidos de animais, pois a extração em fase sólida não se estendia para estas matrizes (BARKER, 2000a). O primeiro trabalho aplicando esta técnica em análise de pesticidas em alimentos foi reportada por LING & HUANG (1995), que detectaram piretróides em vários vegetais.

A principal vantagem desta técnica é a simplicidade do método, baixo consumo de amostra e reagentes, processos de extração e *clean up* da amostra realizados simultaneamente (ALBERO et al, 2003). A DMFS consiste em homogeneizar pequena quantidade do alimento com um adsorvente (sílica, florisil, C-18, etc) em proporções de 1:1 a 1:4 (amostra: adsorvente). Em seguida, a mistura (matriz e adsorvente) é transferida para uma coluna e eluída com solvente apropriado. O extrato recolhido é concentrado e analisado por cromatografia gasosa (LANÇAS, 2004; BARKER, 2000a e b).

Na Tabela 2 estão descritos alguns trabalhos mais recentes utilizando a DMFS em análise de pesticidas e poluentes orgânicos em diversas matrizes.

Tabela 2 – Recentes trabalhos empregando a DMFS

Pesticidas	Matriz	Eluente	Adsorvente	Referência
Fungicidas	Frutas e vegetais	Acetato de etila	C-18	NAVARRO et al, 2002.
Organofosforados e organoclorados	Folha do maracujá	Hexano: acetato de etila	Florisil	ZUIN et al, 2003.
HPA*	Peixe	Acetonitrila	C-18	PENSADO, 2005.
Herbicidas	Óleo de oliva	Acetonitrila	Aminopropil	FERRER et al, 2005.
266 Pesticidas	Maçã	Hexano: diclorometano	Terra de diatomáceas	CHU et al, 2005.

*Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Extração Sólido-Líquido e Purificação em Baixa Temperatura (ESL-PBT)

A partição por abaixamento da temperatura foi usada no passado para isolar pesticidas em plantas e tecidos animais (ANGLIN & MCKINLEY, 1960). Entretanto, a temperatura usada para tal separação era muito baixa (-78 °C), impedindo a utilização da técnica. Em 1997, JUHLER ajustou a temperatura em -10 °C para extrair organofosforados em matrizes gordurosas. Em 2001, esta técnica foi empregada para determinar resíduos de pesticidas em óleo de oliva (LENTZA-RIZOS et al, 2001).

Em 2004, GOULART desenvolveu uma metodologia simples e de baixo custo, para análise de deltametrina e cipermetrina em leite. Este método denominado extração líquido-líquido e purificação por precipitação a baixa temperatura, permitiu determinar piretróides em leite por cromatografia gasosa, sem a necessidade de etapas de *clean up*. Posteriormente, esta técnica foi aplicada por VIEIRA et al. (2005, 2007) para extração de piretróides em amostras de água e solo, passando a técnica a ser denominada para essas matrizes de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) e extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT).

Essa técnica consiste em colocar a amostra líquida ou sólida em contato com um solvente menos denso que a água e com ponto de fusão abaixo de -20 °C. O sistema é agitado e levado ao freezer. Após um determinado período de tempo a fase aquosa é congelada e o solvente orgânico ainda na fase líquida é separado e analisado por cromatografia gasosa. O solvente que apresentou melhores condições de extração e análise de piretróides em amostras de água e solo foi a acetonitrila (VIEIRA, 2005; VIEIRA et al, 2007).

A acetonitrila é considerada um dos melhores solventes extratores para a análise de pesticidas, pois geralmente apresenta compatibilidade com o analito, com o preparo de amostra, na análise por cromatografia gasosa e pode ser empregada para analisar pesticidas de diferentes polaridades. Além disso, a acetonitrila extrai menos interferentes lipofílicos das matrizes quando comparados com a acetona e o acetato de etila (MASTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004).

A acetona também poderia ser empregada para a ESL-PBT, pois é miscível em água, em todas as proporções, além de apresentar menor temperatura de fusão e densidade que a água. Entretanto, a acetona é

incompatível com o sistema CG-DCE, sendo então, necessário após a extração dos pesticidas a evaporação da acetona, e redissolução dos resíduos em outro solvente. Alguns solventes que poderiam ser empregados na ESL-PBT são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Propriedades físicas dos solventes passíveis de serem utilizados na ESL-PBT

Solventes	Ponto de fusão / °C	Ponto de ebulição / °C	Densidade / g cm ⁻³	Miscibilidade em água
Acetonitrila	-44	82	0,7793	miscível
Acetona	-95	56	0,7856	miscível
Isopropanol	-90	82	0,7827	miscível
Metanol	-98	65	0,7872	miscível
Hexano	-95	69	0,6563	imiscível
Acetato de etila	-84	77	0,8942	imiscível

Fonte: LIDE, DAVID R.; CRC Handbook of Chemistry and physics, 1995.

O hexano, mesmo sendo insolúvel em água, pode ser utilizado na ESL-PBT, desde que seja adicionado um co-soluto, como por exemplo, o isopropanol, para a formação de uma única fase.

Efeito de matriz

Embora os métodos de análise de multirresíduos representem formas efetivas de quantificar uma variedade de pesticidas em alimentos, as taxas de recuperação para os compostos de interesse nem sempre são satisfatórias, por apresentarem, muitas vezes, porcentagens de extração acima de 100 % e, ainda, elevados desvios nas análises. Estes resultados estão relacionados com os efeitos de matriz que ocorrem durante a análise cromatográfica (MENKISSOGLU-SPIROUDI & FOTOPOULOU, 2004; HAJSLÓVÁ, & ZROSTLIKOVA, 2003). Este efeito de matriz foi descrito primeiramente por ERNEY e colaboradores (1993) que observaram durante a análise de amostras naturais, a co-extração de vários componentes da matriz, além dos compostos de interesse, os quais provocavam modificações na resposta do pesticida.

A interferência dos componentes da matriz ocorre porque a curva analítica utilizada para quantificar os pesticidas, geralmente, é preparada em solvente puro. Já na análise dos extratos obtidos por um método de extração adequado, além de apresentar os pesticidas, contém uma variedade de compostos pertencentes à matriz que são co-extraídos. Estes compostos interferem durante a análise cromatográfica, pois influenciam na quantidade de pesticida que é transferido para a coluna. Esta interferência dos componentes da matriz, na quantificação dos pesticidas na análise cromatográfica, é denominada de efeito de matriz (GONZALEZ et al, 2002).

O efeito de matriz pode ocorrer em diversas partes do sistema cromatográfico como: injetor, coluna ou detector. O *liner* do injetor (tubo de vidro) é o principal responsável pelo efeito de matriz, pois sítios ativos deste material podem adsorver ou induzir a degradação térmica de alguns analitos. Quando as soluções padrão são preparadas no solvente puro e analisadas por cromatografia, mais sítios ativos do *liner* estão disponíveis para interagir com os pesticidas. Entretanto, quando se analisa os extratos, os pesticidas estão na presença de componentes da matriz, ocorrendo assim uma competição pelos sítios ativos. Dependendo das características do analito e da amostra, os componentes da matriz podem ser adsorvidos no *liner* e mais pesticidas podem ser introduzidos na coluna cromatográfica, originando uma resposta maior para o pesticida quando comparado com a resposta deste em solvente puro (HAJSLOVÁ & ZROSTLIKOVA, 2003). Proporcionando, assim, erroneamente uma alta concentração do pesticida.

Um exemplo disso ocorreu na análise de captan em extratos de laranja. Este pesticida quando preparado em tolueno não havia sido detectado pelo detector por captura de elétrons, provavelmente devido a decomposição ou interação com sítios ativos do *liner*. Depois de várias injeções de amostras de extrato de laranja em que foi se acumulando componentes da matriz no sistema cromatográfico o pico de captan foi quantificado, embora a repetibilidade das amostras tenha sido baixa (HAJSLOVÁ et al, 1998).

Normalmente, para corrigir estes erros nas taxas de recuperação, a curva analítica pode ser preparada substituindo o solvente puro por extratos da matriz isenta de pesticidas, durante a diluição das soluções padrão nas diversas concentrações (RIBANI et al, 2004). Muitos pesticidas têm se mostrado estáveis quando preparados em extratos da matriz. Tem-se

observado a degradação de organofosforados apenas quando se eleva a temperatura de armazenamento dos padrões, caso contrário, quando os padrões preparados no extrato da matriz são armazenados em baixa temperatura, estes são tão estáveis quanto os padrões preparados em solvente puro (KOCOUREK et al, 1998).

Além disso, numa tentativa de reduzir o efeito de matriz pode-se fazer o uso de injeção *on-column*, para evitar a presença de sítios ativos do sistema de injeção, ou freqüentes mudanças do *liner* do injetor. Pode-se também utilizar o método de adição de padrão na própria matriz, ou ainda, etapas de *clean up* dos extratos para reduzirem co-extrativos (POOLE, 2007; SCHENCK & LEHOTAY, 2000).

Outra alternativa é a adição de substâncias químicas similares aos componentes da matriz nos padrões preparados em solvente puro, para ocupar os sítios ativos do *liner*, impedindo a adsorção ou degradação dos pesticidas. Tais substâncias protetoras como o óleo de oliva (ou produtos de degradação destes) têm maior capacidade de fazer ligações de hidrogênio que os pesticidas com os grupos silanóis do *liner* (vidro). Desta forma, estes compostos mascaram os sítios ativos e proporcionam maior transferência dos pesticidas para a coluna (SANCHEZ-BRUNETE et al, 2005).

A intensidade do efeito de matriz pode variar de uma amostra para outra, ou de acordo com a concentração do analito na matriz. HAJSLOVÁ et al (1998) verificou que quanto menor a concentração do analito na amostra, maior será o efeito de matriz. Um fato interessante foi observado por SCHENCK & LEHOTAY (2000) em que o pesticida terbufós não apresentou nenhum efeito de matriz quando analisado em concentrações mais altas. Entretanto, para concentrações mais baixas apresentou significativo efeito de matriz.

O próprio sistema cromatográfico pode influenciar na intensidade do efeito de matriz. Como exemplo, um cromatógrafo a gás utilizando como detector um espectrômetro de massa (EM) apresentou maior efeito de matriz em análise de organofosforados que um detector fotométrico de chama (DFC) para os mesmos pesticidas. Acredita-se ser devido aos tipos diferentes de *liner* e pequeno diâmetro da coluna usados para o CG-EM em relação ao CG-DFC. Além disso, o próprio espectrômetro de massa contribui para o aumento da resposta devido à superfície metálica do detector e o fato de não ocorrer combustão neste (SCHENCK & LEHOTAY, 2000).

As propriedades físico-químicas dos pesticidas e dos interferentes, como polaridade, volatilidade, estabilidade em altas temperaturas, etc. também são fatores relevantes no estudo do efeito de matriz (MENKISSOGLU-SPIROUDI & FOTOPOULOU, 2004). Pesticidas que contém os grupos amidas, sulfonas e/ou ligações P=O, de uma forma geral compostos mais polar, são largamente afetados pela matriz. Ou mesmo compostos de elevada massa molar como os piretróides tendem a apresentar também um aumento da resposta (SANCHEZ-BRUNETE et al, 2005).

Nesse trabalho foram otimizados os métodos de extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura e dispersão da matriz em fase sólida, para determinar os pesticidas clorpirifós, λ - cialotrina, cipermetrina e deltametrina em amostras de tomate.

CAPÍTULO 1

EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO E PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA

1.1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1.1. Preparo de soluções padrão de pesticidas

As soluções empregadas neste trabalho foram preparadas pela solubilização de padrões de clorpirifós (99,0% m/m - Chem Service), cipermetrina (92,4% m/m - Chem Service), λ -cialotrina (86,5% m/m - Syngenta) e deltametrina (99,0% m/m - Chem Service), em acetonitrila (Mallickrodt / HPLC). Soluções estoque de 500,0 mg L⁻¹ foram preparadas para cada padrão e armazenadas em freezer. A partir da diluição das soluções estoque, foi preparada uma solução de trabalho contendo os quatro pesticidas em concentrações de 50,0 mg L⁻¹.

Uma segunda solução de concentração igual a 50,0 mg L⁻¹, utilizada como padrão interno, foi preparada pela solubilização de padrão de bifentrina (92,2 % m/m – FMC do Brasil) em acetonitrila.

1.1.2. Preparo de amostras de tomates hidropônicos fortificadas

Amostras de tomate (aproximadamente 4 a 5 unidades) foram trituradas em processador caseiro e quantidades de polpa iguais a 4,0000 g foram fortificadas com 100,0 μL de solução trabalho contendo os quatro pesticidas na concentração de 50,0 mg L^{-1} . As amostras contaminadas (1,25 mg kg^{-1}) foram deixadas por aproximadamente três horas em frasco aberto para evaporação do solvente.

1.1.3. Otimização da técnica de extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT)

Os ensaios da extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura para análise dos pesticidas clorpirifós, cipermetrina, λ -cialotrina e deltametrina em amostras de tomate foram adaptados da técnica descrita para a extração de deltametrina e cipermetrina em leite (GOULART, 2004) e para extração de quatro piretróides em água e solo (VIEIRA, 2005; VIEIRA et al, 2007).

Em frasco de vidro transparente de 22,0 mL de capacidade, contendo 4,0000 g de polpa de tomate fortificada, foram adicionados 10,0 mL de uma mistura extratora e homogeneizado. Posteriormente, a mistura foi resfriada em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 horas. Após a separação das fases pelo congelamento da fase aquosa e da polpa de tomate, o líquido sobrenadante foi passado por um papel de filtro contendo 1,5000 g de sulfato de sódio anidro (Nuclear). O extrato foi recuperado em balão volumétrico de 10,0 mL em acetonitrila e armazenado em frascos de vidro no freezer, até o momento da análise.

Após a extração, as concentrações dos analitos foram determinadas por cromatografia gasosa, usando detector por captura de elétrons (DCE). Os experimentos realizados na otimização são descritos nos itens 1.1.3.1 e 1.1.3.2.

1.1.3.1. Planejamento de misturas

A composição da mistura extratora utilizada na ESL-PBT foi otimizada realizando um planejamento experimental de misturas de três componentes,

com o objetivo de avaliar a taxa de recuperação dos princípios ativos a partir das modificações da polaridade da mistura extratora.

O modelo de planejamento de misturas com três diferentes solventes e as características das três misturas extratoras avaliadas estão representadas na Figura 1.1 e Tabela 1.1, respectivamente.

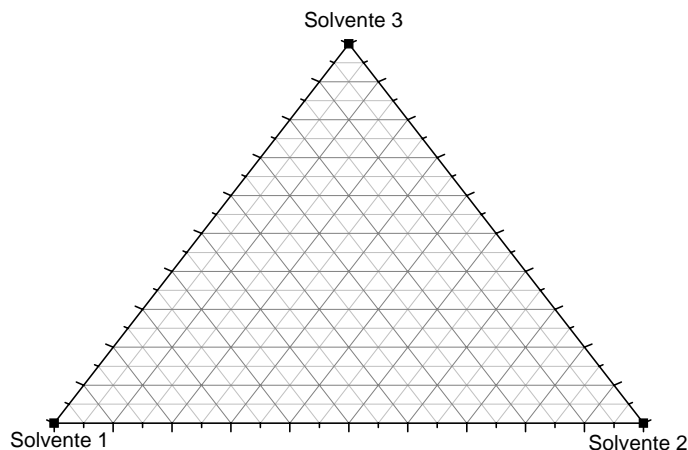


Figura 1.1 - Modelo de planejamento de mistura.

Tabela 1.1 – Descrição dos planejamentos de misturas

Planejamentos de misturas	Solvente 1	Solvente 2	Solvente 3
A	Acetonitrila	Água	Acetato de etila
B	Acetonitrila	Água	Metanol
C	Isopropanol	Água	Hexano

A mistura extratora usada na ESL-PBT deve ser inicialmente homogênea, para que somente após o abaixamento da temperatura ocorra a separação das fases. Assim, quantidades mínimas e máximas de cada solvente da mistura extratora foram estabelecidas para garantir a formação da fase única.

Além disso, os solventes 1 e 2 na ESL-PBT, devem necessariamente possuir limite inferior maior do que zero, pois o solvente 1 constituirá a fase líquida após o congelamento enquanto que o solvente 2 formará a fase sólida.

Considerando, então, as restrições da mistura extratora na ESL-PBT, os limites mínimos e máximos de cada solvente, foram estabelecidos, como representado na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 – Limites inferiores e superiores das quantidades de cada solvente, expressos em % v/v

Solventes	Limite inferior (%) – Limite superior (%)
1	65 – 80
2	5 – 20
3	0 – 15

A partir das quantidades mínimas e máximas de cada solvente, foi delimitada, então, a região de estudo no planejamento, limitado pelos vértices do triângulo 1, 2 e 3, Figura 1.2.

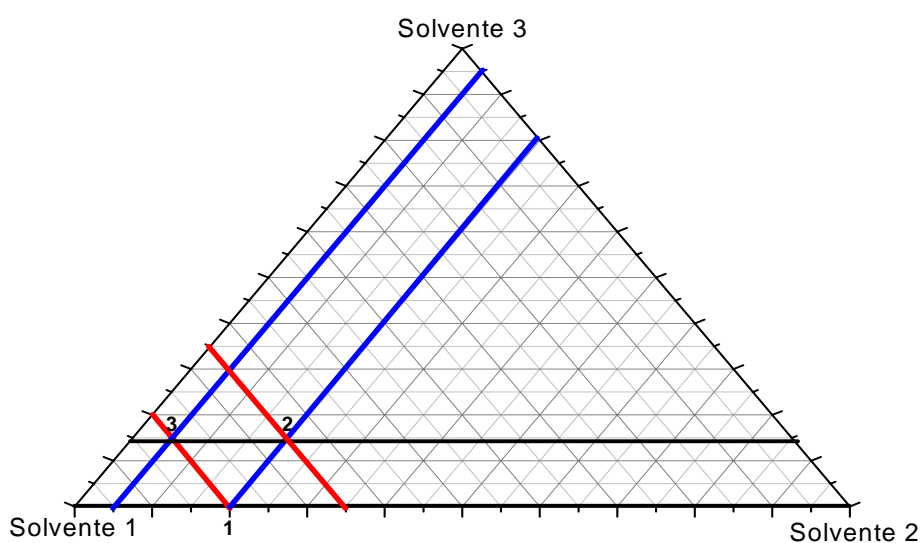


Figura 1.2 – Região de estudo do planejamento de mistura, aplicados na otimização do método ESL-PBT para extração de quatro pesticidas em tomate.

Os vértices do triângulo 1, 2 e 3 representam três tipos de misturas extratoras de polaridades diferentes.

Em cada mistura extratora a proporção entre os solventes foi determinada pelos pseudocomponentes, que é uma espécie de codificação. Quando um solvente foi adicionado em sua quantidade máxima o pseudocomponente foi 0,5 no planejamento de misturas. Quando a quantidade mínima do solvente foi usada, o pseudocomponente correspondente foi zero. A soma dos pseudocomponentes em uma fase extratora foi sempre igual a 1.

Estes cálculos dos pseudocomponentes foram obtidos pela equação 1.1:

$$X_{\text{pseudocomp.}} = \frac{C(\%) - Li}{100 - \sum Li} \quad (\text{Equação 1.1})$$

Sendo que:

X = Pseudocomponentes dos solventes 1, 2 ou 3.

C(%) = Porcentagem do solvente na mistura analisada.

Li = Limite inferior do solvente (Tabela 1.2)

$\sum Li$ = Somatório de todos os limites inferiores dos três solventes que compõe a mistura. Neste planejamento, igual a 70%.

A Tabela 1.3 resume todas as informações necessárias para o planejamento de misturas como os pseudocomponentes e a porcentagem de cada solvente na mistura.

Tabela 1.3 – Composição das fases extratoras preparadas com misturas dos solventes 1, 2 e 3, em valores reais dos componentes (%) e em pseudocomponentes (X)

Mistura	pseudocomponentes			Solvente 1 (%)	Solvente 2 (%)	Solvente 3 (%)
	X ₁	X ₂	X ₃			
1	0,5	0,5	0	80	20	0
2	0	0,5	0,5	65	20	15
3	0,5	0	0,5	80	5	15

* O volume total após a mistura dos três solventes foi sempre 10,0 mL.

Para cada mistura de solventes foi avaliada a porcentagem de extração de clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina presentes em amostra de tomate.

Os resultados obtidos da porcentagem de recuperação dos pesticidas, usando o modelo experimental e misturas, foram avaliados estatisticamente utilizando o software *Statistica*® versão 6.0.

1.1.3.2. Otimizações univariadas

Para melhorar a eficiência da extração dos quatro pesticidas em amostras de tomate e obter extratos mais apropriados para análise

cromatográfica foram realizadas otimizações univariadas, utilizando a mistura extratora que melhores resultados apresentaram.

1.1.3.2.1. Efeito do sistema de agitação da ESL-PBT na porcentagem de extração dos pesticidas em tomate

Avaliou-se a influência do mecanismo de homogeneização da amostra com a mistura extratora na eficiência de extração dos pesticidas estudados. As estratégias de agitação foram: agitação manual, agitação mecânica em mesa agitadora (Tecnal TE - 420) por 10 minutos a 25 °C e 175 oscilações por minuto, ultra-som por 1 minuto e ultra-som por 10 minutos. Em cada estratégia, a técnica de ESL-PBT foi utilizada como descrito no item 1.1.3., usando como mistura extratora acetonitrila, água e acetato de etila (8,0: 0,5: 1,5).

1.1.3.2.2. Efeito da força iônica na porcentagem de extração dos pesticidas em tomate pela ESL-PBT

O efeito da força iônica na porcentagem de extração dos quatro pesticidas em amostras de tomate foi avaliado usando o método descrito no item 1.1.3., usando como mistura extratora acetonitrila, água e acetato de etila (8,0: 0,5: 1,5), sendo a mistura submetida ao ultra-som por 1 minuto. Entretanto, a água adicionada à amostra para compor a mistura extratora foi substituída por uma solução de NaCl na concentração de 0,20 mol L⁻¹, para aumentar a força iônica do meio.

1.1.3.2.3. Avaliação do efeito de matriz na porcentagem de recuperação dos pesticidas.

Para observar o efeito de matriz na ESL-PBT em amostras de tomate na análise de clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina por cromatografia gasosa foram feitos dois estudos:

1.1.3.2.3.1. Superposição de matriz

Quando soluções padrão são preparadas em solvente puro e analisadas por cromatografia gasosa, estas apresentam respostas diferentes das mesmas soluções padrão preparadas no extrato da matriz, isenta de pesticidas. Para avaliar essa influência dos componentes da matriz na resposta do detector foram preparadas duas séries de soluções padrão contendo os quatro pesticidas nas concentrações de 5; 10; 25; 75; 150; 300; 500; 625 e 750 $\mu\text{g L}^{-1}$. A primeira série foi preparada pela diluição da solução de trabalho (50,0 mg L^{-1}) contendo os quatro pesticidas em acetonitrila pura. A segunda série dos padrões foi preparada pela diluição da mesma solução de trabalho no extrato da matriz, obtido da ESL-PBT de tomates hidropônicos isentos de pesticidas.

O efeito de matriz também foi avaliado pela comparação das porcentagens de recuperação obtidas quando as soluções padrões preparadas em acetonitrila e no extrato da matriz foram empregadas para quantificar os princípios ativos em amostras de tomate previamente fortificadas.

1.1.3.2.3.2. Variação da resposta do detector

A variação da resposta (área) dos pesticidas associada ao efeito de matriz foi avaliada pela comparação dos resultados de injeções sucessivas (três vezes) de uma solução padrão em acetonitrila, antes e após injeções sucessivas (cinco vezes) de um extrato obtido da ESL-PBT de amostra de tomates isentas de pesticidas.

1.1.3.2.4. Eficiência de adsorventes no *clean up* dos extratos obtidos na ESL-PBT de amostras de tomate

Os extratos orgânicos obtidos da ESL-PBT de amostras de tomate foram submetidos a uma etapa de *clean up* para melhorar a qualidade dos mesmos com vistas à análise cromatográfica. Após o processo de resfriamento a -20 °C da mistura, a fase orgânica líquida foi passada por um papel de filtro contendo uma camada de sulfato de sódio anidro, (1,5000 g) e uma camada inferior de adsorvente (0,5000 g). Os extratos foram recuperados para 10,0 mL em acetonitrila e armazenados no freezer até o momento da análise

cromatográfica. Os adsorventes avaliados foram florissil (J. B. Barcker), sílica gel (Mercker), octadecil C-18 (PR cola) e carvão ativado (Carlo Erba).

Também foi estudado o *clean up* dos extratos com adição do carvão ativado diretamente na mistura da amostra com a fase extratora, antes do processo de homogeneização. Analisou-se o *clean up* com 0, 5, 10 e 15 mg de carvão ativo.

O uso do carvão ativado para o *clean up* dos extratos foi avaliado pelas características dos cromatogramas (ruídos da linha de base e picos interferentes), pela porcentagem de extração dos pesticidas e pela intensidade da cor dos extratos, sendo este avaliado espectrofotometricamente na região do UV-visível.

1.1.4. Análise cromatográfica

A identificação e quantificação dos extratos de pesticidas foram realizadas em um cromatógrafo a gás (Shimadzu, GC – 17A), com um detector por captura de elétrons (DCE). Para promover a separação entre os picos dos compostos de interesse no menor tempo de análise, estabeleceram-se as condições ideais de análise como temperatura da coluna, do injetor e do detector, vazão dos gases e escolha do tipo de coluna cromatográfica.

As condições analíticas fixadas foram as seguintes:

Coluna capilar: Fase estacionária: 5% difenil e 95% dimetilsiloxano, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,1 μ m de espessura de filme.

Programação de temperatura da coluna: 200 °C $\xrightarrow{10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}}$ 290 °C (2 min)

Tempo total de análise: 11 minutos

Temperatura do injetor: 280 °C

Temperatura do detector: 300 °C

Volume injetado: 1,0 μ L

Gás de arraste: Nitrogênio

Vazão do gás de arraste: 1,2 mL min⁻¹

Divisão de fluxo: 1:5

1.1.4.1. Curva analítica (método da padronização interna)

Foram preparadas soluções padrão de concentrações crescentes dos analitos (5; 10; 25; 75; 150; 300; 500; 625 e 750 $\mu\text{g L}^{-1}$) utilizando o principal solvente da mistura extratora (acetonitrila). Nestas soluções adicionaram-se 100,0 μL de solução de bifentrina a 500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizada como padrão interno (PI). Após análise dessas soluções, foi construído um gráfico relacionando a razão de áreas (área do analito/ área do padrão interno) com as respectivas concentrações dos analitos. Foram obtidos por regressão linear, as equações das retas e os parâmetros que permitiram calcular as concentrações dos analitos nas amostras.

Nos extratos das amostras de tomates também foram adicionadas a mesma quantidade de padrão interno.

1.1.4.2. Método otimizado da ESL-PBT e análise por cromatografia gasosa de quatro pesticidas em tomate.

Em amostras de tomate (4,0000 g) previamente processadas e fortificadas com 1,25 mg kg^{-1} de cada um dos pesticidas, foram adicionados 10,0 mL da mistura extratora (8,0 mL de acetonitrila, 0,50 mL de água destilada e 1,5 mL de acetato de etila). A mistura foi sonicada por 1 minuto e deixada no freezer a aproximadamente $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 horas. O solvente orgânico ainda líquido foi passado por um papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro. O volume do extrato foi ajustado em balão volumétrico de 10,0 mL com acetonitrila e armazenados no freezer até o momento da análise.

As análises cromatográficas dos extratos foram feitas usando as condições cromatográficas descritas no item do 1.1.4.

1.1.5. Validação do método analítico

Para assegurar a credibilidade do método analítico desenvolvido, este foi submetido a uma validação, conforme proposto por RIBANI et al (2004). Os critérios considerados, neste trabalho, para a validação do método de extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura e análise por CG-DCE, estão dispostos na Tabela 1.4.

Tabela 1.4 – Parâmetros de desempenho analítico para validação do método ESL-PBT e análise por CG

Parâmetros	
Seletividade	-
Limite de detecção e quantificação	-
Linearidade de resposta do detector	-
Precisão	Repetitividade Precisão intermediária
Exatidão	Ensaio de recuperação Comparação de métodos

1.1.5.1. Seletividade

A seletividade foi avaliada comparando-se os cromatogramas dos extratos obtidos após extração dos componentes da matriz isenta dos pesticidas em estudo, com os cromatogramas dos extratos da amostra de tomate fortificada, preparada e analisada conforme o procedimento otimizado.

1.1.5.2. Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada um dos pesticidas foram determinados usando os parâmetros da curva analítica. Para este cálculo, construiu-se uma curva analítica utilizando soluções padrão contendo clorpirifós, cipermetrina, λ -cialotrina e deltametrina nas concentrações 12, 8, 6, 4, 2 $\mu\text{g L}^{-1}$. O LD e o LQ foram considerados como 3,3 e 10 vezes, respectivamente, a razão entre os coeficientes linear e angular da curva analítica (RIBANI et al 2004).

1.1.5.3. Linearidade de resposta do detector

A linearidade de resposta do detector foi verificada pela curva analítica preparada, conforme descrito no item 1.1.4.1, em que padrões de pesticidas em acetonitrila foram preparados nas concentrações de 5, 10, 25, 75, 150, 300, 500, 625 e 750 $\mu\text{g L}^{-1}$. Após a análise cromatográfica, foi construída uma curva analítica, relacionando a razão de áreas (área do analito/ área do padrão

interno) com as concentrações dos analitos. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação determinado pela regressão linear.

1.1.5.4. Precisão

A precisão do método de extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura e análise por cromatografia gasosa foram verificadas sob condições de repetitividade e precisão intermediária.

A repetitividade do método de extração dos pesticidas clorpirifós, cipermetrina, λ -cialotrina e deltametrina em amostras de tomate foram determinadas, conforme sugerido pelo INMETRO, realizando-se sete extrações idênticas dos pesticidas, segundo procedimento descrito no item 1.1.4.2. determinando o desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV).

A precisão intermediária foi analisada por meio da porcentagem de recuperação dos pesticidas e respectivos coeficientes de variação, fazendo-se o procedimento de extração descrito no item 1.1.4.2. em triplicatas e em três dias distintos.

1.1.5.5. Exatidão

Entre as maneiras de avaliar a exatidão de um método pode-se recorrer aos ensaios de recuperação.

Os ensaios de recuperação foram realizados em amostras de tomate fortificadas em diferentes níveis: 0,025; 0,050; 0,100 e 0,250 mg kg⁻¹ de cada um dos pesticidas, correspondendo, respectivamente, a 1, 2, 4 e 10 vezes o limite de quantificação dos pesticidas. Estas amostras em triplicatas foram submetidas ao método de ESL-PBT conforme descrito no item 1.1.4.2. e analisadas por cromatografia gasosa nas condições descritas no item 1.1.4. A exatidão foi avaliada pelo coeficiente de variação das medidas.

1.1.6. Determinação dos pesticidas em amostras de tomates

A técnica de ESL-PBT para determinação dos pesticidas clorpirifós, cipermetrina, λ -cialotrina e deltametrina otimizada e validada, foi aplicada em

amostras de tomates coletadas em três estabelecimentos comerciais de Viçosa-MG.

Para a coleta das amostras foram utilizados sacos de polietileno para armazenar 1 kg de tomate (cerca de 10 unidades) escolhidos ao acaso e transportados ao laboratório para serem estocados a baixa temperatura até o momento de preparo para a análise. Os tomates foram cortados e triturados em processadores caseiros. Alíquotas de 4,0000 g da amostra de tomate foram retiradas e submetidas ao processo de extração otimizado, conforme descrito no item 1.1.4.2. e analisado por cromatografia gasosa.

1.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.2.1. Análise cromatográfica

O detector por captura de elétrons (DCE) apresenta alta sensibilidade aos compostos halogenados, possibilitando a quantificação dos pesticidas clorpirifós, cipermetrina, λ -cialotrina e deltametrina na análise cromatográfica. A identificação dos compostos estudados foi realizada por comparação entre os tempos de retenção (t_R) destes nos extratos com os da solução padrão. Na Figura 1.3 A está representado o cromatograma da solução padrão dos pesticidas em acetonitrila. O cromatograma dos extratos após a ESL-PBT obtidos a partir de amostras de tomate fortificadas com os pesticidas é ilustrado na Figura 1.3 B.

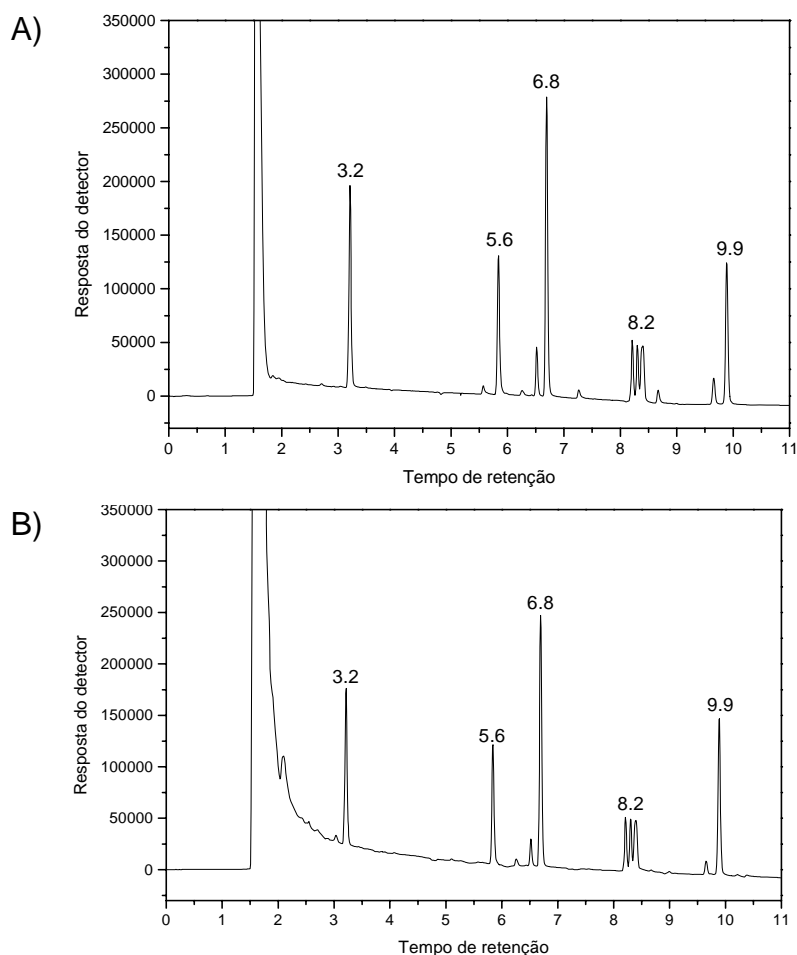


Figura 1.3 – A) Cromatograma da solução padrão de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ dos pesticidas , B) Cromatograma da amostra fortificada com $1,25 \text{ mg kg}^{-1}$ ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) dos pesticidas e submetidas a ESL-PBT ($t_R = 3,2 \text{ min}$: clorpirifós, $t_R = 5,6 \text{ min}$: padrão interno, $t_R = 6,8 \text{ min}$: cialotrina, $t_R = 8,2 \text{ min}$: cipermetrina, $t_R = 9,9 \text{ min}$: deltametrina).

Pelas características dos cromatogramas (Figura 1.3) observa-se que as condições de análise (item 1.1.4.), como a programação de temperatura, coluna utilizada e o fluxo do gás de arraste, possibilitou uma boa separação dos compostos avaliados, inclusive dos isômeros. A λ -cialotrina ($t_R = 6,8 \text{ min}$.) e a deltametrina ($t_R = 9,9 \text{ min}$.) que apresentam dois isômeros cada uma, foram quantificadas somando-se a área total dos pesticidas isoméricos. Caso semelhante foi realizado com a cipermetrina que apresenta três isômeros ($t_R = 8,2 \text{ min}$.).

Comparando-se os cromatogramas da amostra fortificada (Figura 1.3 B) com o da solução padrão dos pesticidas (Figura 1.3 A), observa-se na região

próxima ao pico atribuído ao solvente, nos três primeiros minutos de análise, alargamento do pico. Isso indica que compostos polares da matriz são extraídos e eluídos próximo ao solvente.

1.2.2. Otimização da técnica de extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT)

1.2.2.1. Planejamento de misturas

Em 2004, GOULART descreveu o método de extração líquido-líquido e partição em baixa temperatura, ELL-PBT, para extração e análise de piretróides em leite por cromatografia gasosa. Posteriormente, a técnica foi otimizada e validada por VIEIRA et al (2007) para extração de quatro piretróides em água. Na descrição da metodologia recomenda-se usar 8 mL de uma mistura extratora contendo acetonitrila (6,5 mL) e acetato de etila (1,5 mL). Esta mistura, nessa proporção, permite formar uma fase única com a amostra aquosa (4,0 mL). Com o abaixamento da temperatura a amostra aquosa é solidificada, restando ainda no estado líquido a mistura extratora.

A acetonitrila, além de ser descrita como sendo um dos melhores solventes na extração de pesticidas (MASTOVSKA & LEHOTAY, 2004), tem as características necessárias para ser usada na técnica de ESL-PBT. A acetonitrila forma com a água uma fase única em qualquer proporção e tem o ponto de congelamento ($T_f = -46\text{ °C}$) bem mais baixo que a temperatura utilizada no método (-20 °C). Para que a sua eficiência como solvente extrator seja ampliada é necessário modificar sua polaridade para que seja aplicado para a extração de pesticidas de diferentes polaridades. Essas modificações não podem alterar as características da mistura extratora com relação à formação da fase única e das características de congelamento.

Além desses relatos na literatura, não se encontrou nenhum estudo sistemático realizado para extração de pesticidas em amostras de hortaliças, empregando esta técnica. Assim, na otimização do método para amostras de tomate, foram estabelecidas previamente quantidades máximas e mínimas de solventes, para que a mistura extratora mantivesse as características necessárias.

Estudo recente realizado por Vieira (2005) demonstrou que a proporção água: acetonitrila 1:2 resultou em melhores porcentagens de extração de pesticidas na ESL-PBT. Assim, considerando que a amostra de tomate (4,0000 g) contém aproximadamente 95% de água, optou-se por acrescentar 0,5 mL de água e 9,5 mL de fase orgânica para que a proporção água: solvente orgânico aproximasse da relação 1:2. Para avaliar a influência da água na extração dos pesticidas, analisou-se também misturas extratoras acrescentando um volume máximo de água de 2,0 mL em 8,0 mL de fase orgânica, para obter uma relação água : solvente orgânico cerca de 1:1.

A polaridade da acetonitrila pode ser reduzida pela adição de acetato de etila. Assim a extração dos pesticidas menos polares é favorecida por esta combinação. Entretanto, a miscibilidade do acetato de etila em acetonitrila e água são limitadas. VIEIRA et al (2007) determinou que para a proporção 1:2 (fase aquosa: fase orgânica) a quantidade máxima de acetato de etila adicionado em 8 mL de fase orgânica fosse 1,5 mL, para não romper o equilíbrio da fase única. Por isso, adotou-se um volume de acetato de etila de 1,5 mL em 10,0 mL de fase extratora, para garantir a formação de uma fase homogênea.

As porcentagens de extração, para os quatro pesticidas, usando as misturas 1, 2 e 3 do planejamento de mistura A, nas proporções descritas na Tabela 1.3 (pg. 18), estão na Tabela 1.5.

Tabela 1.5 – Porcentagem de recuperação dos pesticidas e respectivos desvios-padrão na análise de amostras de tomate fortificadas, usando o planejamento de mistura A (Tabela 1.1, pg. 16) e composição da misturas extratora (Tabela 1.3, pg. 18)

Mistura	Clorpirifós R (%)	λ -Cialotrina R (%)	Cipermetrina R (%)	Deltametrina R (%)
1	70,73 \pm 1,83	69,44 \pm 0,18	73,51 \pm 2,12	73,08 \pm 0,21
2	75,19 \pm 0,83	76,16 \pm 1,51	81,15 \pm 2,56	80,94 \pm 0,76
3	82,71 \pm 2,75	86,02 \pm 3,30	95,37 \pm 4,71	95,58 \pm 2,64

A mistura 1 constituída por acetonitrila, água e acetato de etila nas proporções de 80%, 20%, 0%, respectivamente, é a mistura mais polar. Em contra partida a mistura extratora 3 é a de menor polaridade (80% acetonitrila,

5% água e 15% acetato de etila). Já a mistura 2 (65% acetonitrila, 20% água e 15% acetato de etila) possui polaridade intermediária.

Os resultados da Tabela 1.5 indicam que à medida que diminui a polaridade da mistura extratora, a porcentagem de recuperação dos pesticidas aumenta. Sendo assim, a mistura 3, menos polar, proporciona melhor extração dos pesticidas.

Considerando as quantidades máximas extraídas de cada um dos pesticidas em função da polaridade da mistura extratora do planejamento de misturas A, observa-se, na Figura 1.4, que a polaridade da mistura afeta mais a deltametrina e a cipermetrina, enquanto que para o clorpirifós o efeito da variação da polaridade da mistura extratora é menos significativo. Isso está relacionado com a solubilidade dos pesticidas na fase aquosa, pois o clorpirifós dissolve na água até $1,4 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto que os piretróides λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina solubilizam-se, respectivamente, $0,004$; $0,004$ e $0,0002 \text{ mg L}^{-1}$. Assim, o clorpirifós é mais solúvel em água que os piretróides e isso explicam a menor influência da polaridade da fase orgânica na extração deste pesticida em relação aos piretróides.

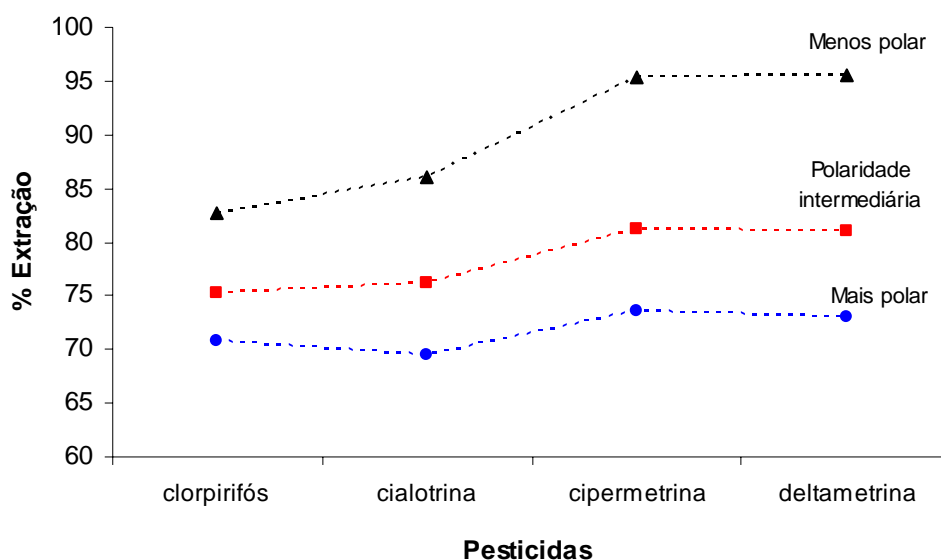


Figura 1.4 - Influência da polaridade da mistura extratora na porcentagem de extração para os pesticidas clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina.

O conjunto das porcentagens de extração, expressos na Tabela 1.5, foi utilizado para ajustar o modelo linear, equação (1.2), usando o método dos mínimos quadrados, para cada pesticida.

$$Y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 \quad \text{Equação (1.2)}$$

Este ajuste foi obtido com auxílio do *software statistica®* que fornece tais modelos e determina o erro padrão de cada coeficiente (Tabela 1.6).

Tabela 1.6 – Coeficientes do modelo linear estimados para cada pesticida em função das porcentagens de recuperação obtidos pela técnica ESL-PBT de amostras de tomate, usando o planejamento de misturas A (acetonitrila, água e acetato de etila)

Pesticidas	Equações do modelo ajustado (± erro padrão)	R ²
Clorpirifós	Y = 78,25 X ₁ + 63,22 X ₂ + 87,17 X ₃ (± 2,05) (± 2,05) (± 2,05)	0,9460
λ-Cialotrina	Y = 79,30 X ₁ + 59,58 X ₂ + 92,74 X ₃ (± 2,58) (± 2,58) (± 2,58)	0,9545
Cipermetrina	Y = 87,73 X ₁ + 59,29 X ₂ + 103,01 X ₃ (± 4,08) (± 4,08) (± 4,08)	0,9368
Deltametrina	Y = 87,71 X ₁ + 58,44 X ₂ + 103,44 X ₃ (± 2,05) (± 2,05) (± 2,05)	0,9857

X₁ = pseudocomponente da acetonitrila

X₂ = pseudocomponente da água

X₃ = pseudocomponente do acetato de etila

A contribuição de cada pseudocomponente no processo de extração dos pesticidas está representada na equação do modelo linear ajustado. Observa-se que o pseudocomponente da água (X₂) tem pesos bem próximos para os pesticidas λ-cialotrina, cipermetrina e deltametrina, ou seja, a quantidade de água afeta a extração destes pesticidas de forma similar. Já a equação do modelo ajustado para o clorpirifós, devido a sua maior solubilidade em água, possui um coeficiente maior para X₂ em relação aos piretróides. Como X₂ possui menor coeficiente entre os três pseudocomponentes analisados, isso significa que a água apresenta menor contribuição para a extração dos pesticidas, por isso deverá ser utilizada a quantidade mínima na mistura extratora.

Analisando os coeficientes do pseudocomponente X₁, acetonitrila, os pesticidas podem ser separados em dois grupos, de acordo com a semelhança dos coeficientes. A acetonitrila proporciona melhor extração da cipermetrina e

deltametrina, porque possuem massas molares maiores em relação ao clorpirifós e λ -cialotrina.

No entanto, resultados mais satisfatórios são obtidos com a adição do acetato de etila, pois os pesos do pseudocomponente (X_3) na mistura extratora, para todos os pesticidas, são maiores, principalmente para a cipermetrina e deltametrina. Por isso o acetato de etila deve ser adicionado na quantidade máxima.

Para avaliar a qualidade dos ajustes do modelo linear foi feita uma análise de variância para cada pesticida. Os resultados dispostos na Tabela 1.7 mostram, pelos valores do teste F, que existe pelo menos um coeficiente significativo ao nível de 95% de confiabilidade no modelo linear para cada pesticida. Entretanto, a análise da variância não especifica qual, ou quais, coeficientes são mais importantes. Para isso, foi realizado o teste t de “STUDENT” calculado pelo próprio programa do *statistica*® ao nível de 95% de probabilidade, para os coeficientes da Tabela 1.6, sendo que todos estes coeficientes apresentaram-se significativos, mostrando que eles, realmente, descrevem o comportamento dos sistemas de misturas estudados.

Tabela 1.7 – Análise da variância para o ajuste do modelo linear aplicado às respostas do planejamento de mistura para cada pesticida

Pesticidas	Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Clorpirifós	Regressão	146,51	2	73,26	26,26*
	Desvio	8,37	3	2,79	
	Erro puro	8,37	3	2,79	
	Total	154,88	5	30,98	
λ -Cialotrina	Regressão	278,18	2	139,09	31,44*
	Desvio	13,27	3	4,43	
	Erro puro	13,27	3	4,43	
	Total	291,46	5	58,29	
Cipermetrina	Regressão	492,29	2	246,15	22,22*
	Desvio	33,23	3	11,08	
	Erro puro	33,23	3	11,08	
	Total	525,52	5	105,10	
Deltametrina	Regressão	521,53	2	260,76	103,18*
	Desvio	7,58	3	2,53	
	Erro puro	7,58	3	2,53	
	Total	529,10	5	105,82	

* Significativo a um nível $\alpha = 0,05$

Os resultados comentados anteriormente são mais bem entendidos observando a Figura 1.5 A, B, C, D, em que estão representadas as superfícies de respostas no triângulo cujos vértices correspondem aos pseudocomponentes (0,5; 0,5; 0,5) obtidas no planejamento de mistura A para os pesticidas clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, geradas pelo *software statistica*®.

As curvas de nível mostram que a extração de todos os pesticidas é favorecida com o aumento da quantidade de acetato de etila na mistura, principalmente para a cipermetrina (Figura 1.5 C) e a deltametrina (Figura 1.5 D) em que se espera uma extração próxima a 100% com o aumento gradativo do acetato de etila.

Para o clorpirifós (Figura 1.5 A) e λ -cialotrina (Figura 1.5 B), espera-se uma extração máxima de 86 e 90%, respectivamente. Considerando que estes resultados pertencem a uma extração de multirresíduos de uma matriz complexa como o tomate, os resultados são considerados bastante satisfatórios.

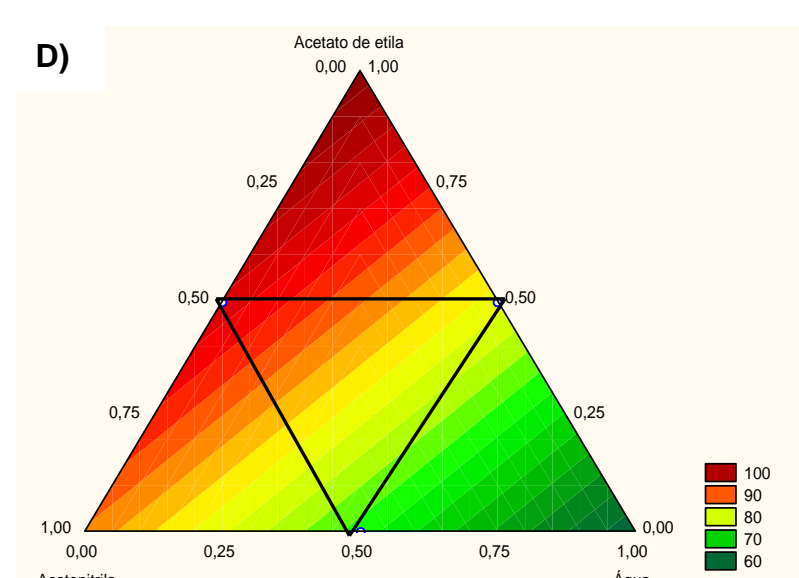
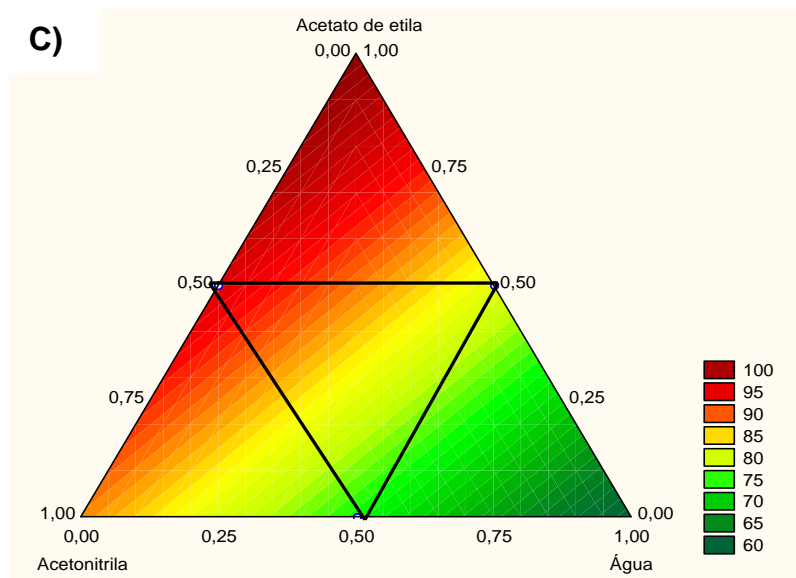
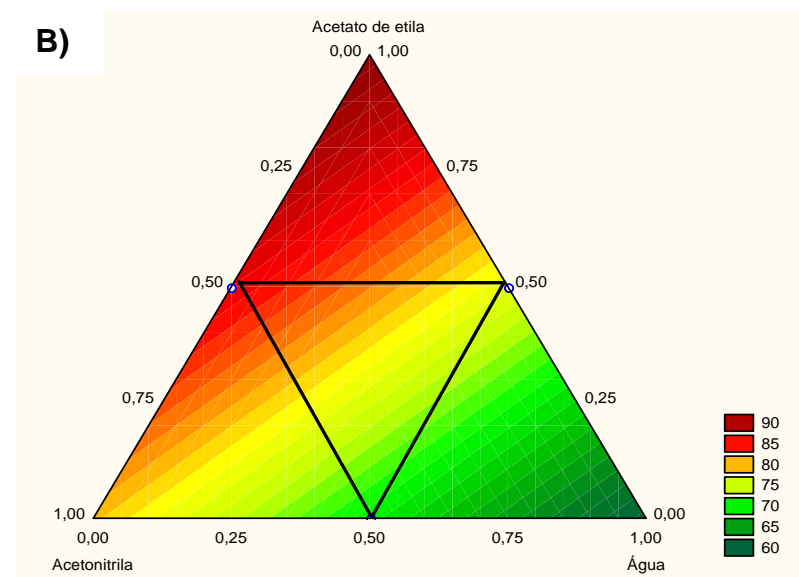
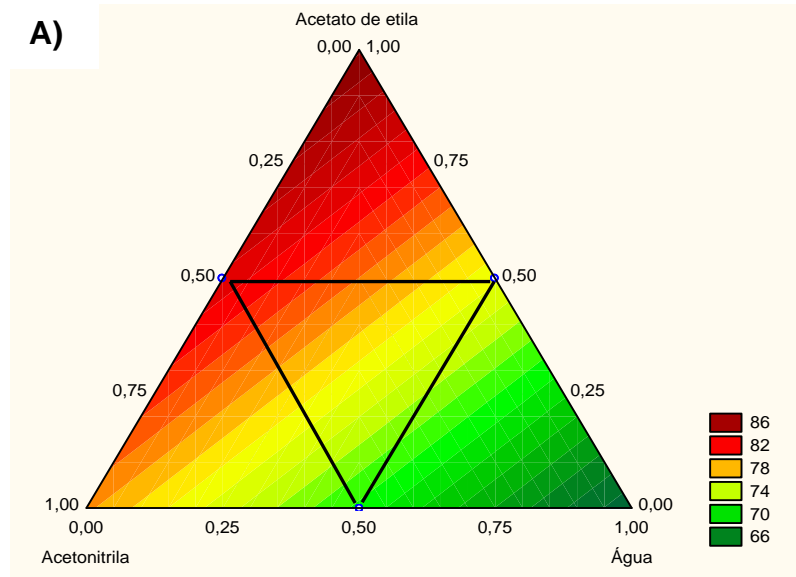


Figura 1.5 - Curvas de nível das misturas de solventes acetonitrila, água e acetato de etila, em termos de pseudocomponentes. Modelo linear para a extração: A) clorpirifós, B) λ -cialotrina, C) cipermetrina, D) deltametrina.

O planejamento de mistura B, usando acetonitrila, água e metanol, tornando a mistura mais polar, também foi avaliado. A presença do metanol como um dos componentes da mistura dificulta o congelamento da fase aquosa. Uma característica vantajosa é que o extrato ficou mais claro pela menor extração de carotenóides da matriz, o que possibilita uma menor interferência de componentes da amostra na análise cromatográfica.

O planejamento de mistura C, usando os solventes isopropanol, água e hexano, mostrou-se inadequado para análise por CG, pela grande quantidade de pigmentos nos extratos. Extratos menos puro, podem diminuir a vida útil da coluna e de outras partes do equipamento.

Assim, com resultados pouco satisfatórios usando os planejamentos B e C optou-se por abandonar essas duas possibilidades. O planejamento de mistura A (acetonitrila, água e acetato de etila), com resultados mais aceitáveis foi avaliado com relação a outras variáveis como estratégia de homogeneização, força iônica e *clean up* dos extratos.

1.2.2.2. Efeito do sistema de agitação da ESL-PBT na porcentagem de extração dos pesticidas em tomate

A agitação é uma etapa importante durante a extração, pois ocorre maior interação dos solventes com os componentes da matriz semi-sólida, principalmente os pesticidas. Desta forma, as amostras foram submetidas a quatro tipos diferentes de agitação (agitação manual, agitador mecânico por 10 minutos, ultra-som por 1 e 10 minutos). Os resultados são ilustrados na Figura 1.6.

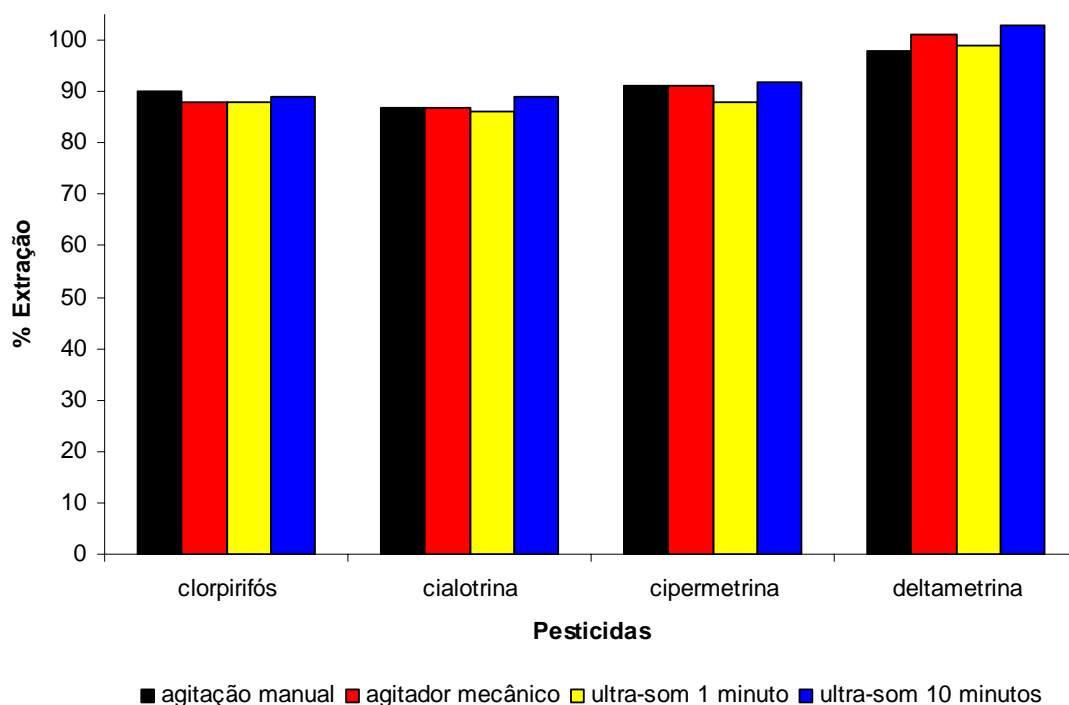


Figura 1.6 – Influência do mecanismo de agitação na porcentagem de extração de quatro pesticidas em amostras de tomate por ESL-PBT.

Resultados semelhantes foram encontrados para as diferentes estratégias de agitação. No entanto, a agitação mecânica, em mesa agitadora, produziu um maior desvio padrão (Figura 1.7), o que pode ser explicado pela aderência dos compostos nas paredes do recipiente de extração. A homogeneização em ultra-som por um minuto conferiu uma melhor precisão dos dados, por isso optou-se por esta forma de agitação da mistura.

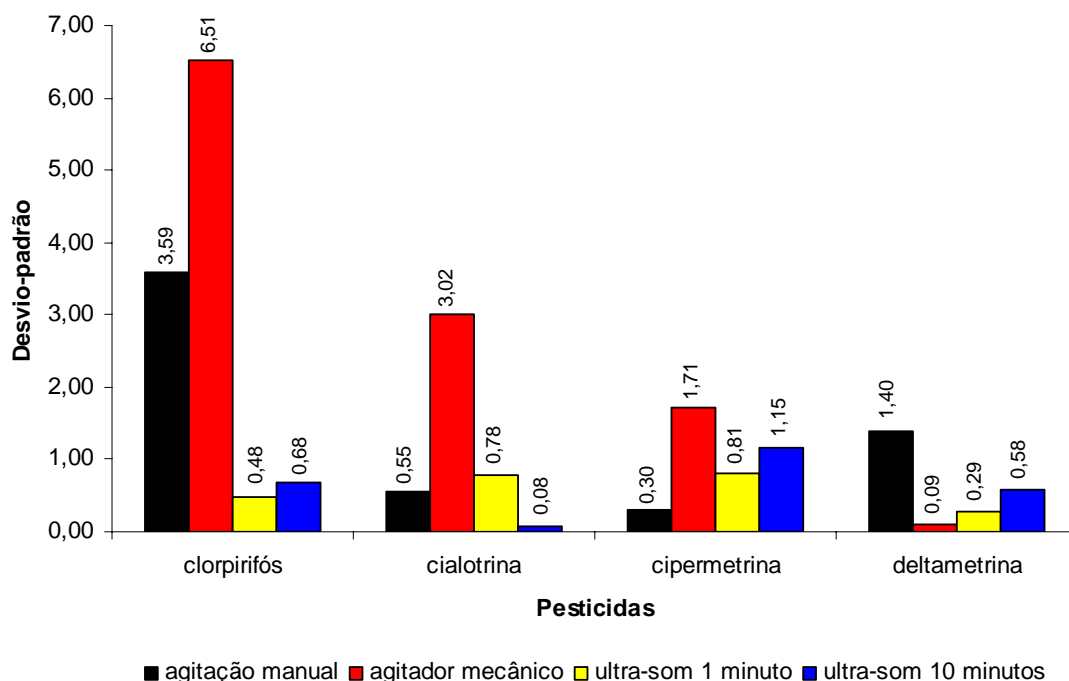


Figura 1.7 - Desvio padrão das porcentagens de extração médias, usando diferentes estratégias de homogeneização da amostra, na ESL-PBT em amostras de tomates.

1.2.2.3. Efeito da força iônica na porcentagem de extração dos pesticidas em amostras de tomate

O aumento da força iônica é sempre recomendado na extração de pesticidas em amostras aquosas, pois a adição de um sal à mistura extratora pode melhorar a taxa de recuperação, particularmente, no caso de analitos polares. O aumento da força iônica provoca redução na solubilidade do analito na matriz, facilitando a sua extração pela fase orgânica (LANÇAS, 2004). Além de melhorar a porcentagem de extração, o aumento da força iônica diminui a formação de emulsões.

Entretanto, o aumento considerável da força iônica pode romper o equilíbrio da fase única na ESL-PBT, antes do congelamento da amostra, fenômeno denominado de *salting-out*. Assim, para manter as características da mistura extratora (80% de acetonitrila, 5% de água e 15% de acetato de etila), e avaliar o efeito da força iônica, o volume de água foi substituído por uma solução de NaCl 0,20 mol L⁻¹. Os resultados obtidos após avaliação deste parâmetro estão representados na Figura 1.8.

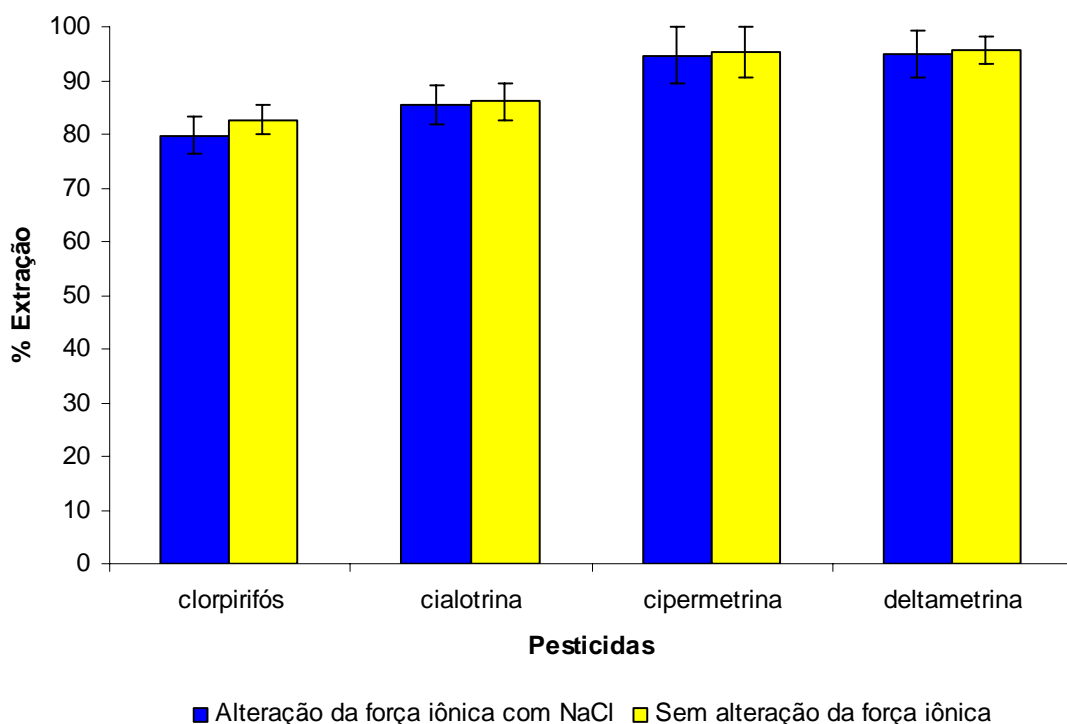


Figura 1.8 – Porcentagem de extração de pesticidas e os respectivos desvio padrão em amostra de tomate, obtidas sem e com alteração da força iônica (solução de NaCl 0,20 mol L⁻¹) da mistura extratora na ESL-PBT.

Os resultados obtidos para a extração dos pesticidas com o aumento da força iônica do meio são estatisticamente iguais à porcentagem de extração dos pesticidas sem alterar a força iônica, ao nível de 95% de probabilidade pelo teste t. Observações semelhantes foram feitas por VIEIRA et al (2007), em que a força iônica do meio não interferiu significativamente na extração de piretróides em água por ESL-PBT.

1.2.2.4. Avaliação do efeito de matriz na porcentagem de recuperação dos pesticidas.

A taxa de recuperação de pesticidas em alimentos, nem sempre é satisfatória devido aos efeitos de matriz na análise cromatográfica. A quantificação dos compostos pode ser afetada pela presença de compostos co-extraídos da matriz. A presença dessas impurezas nas amostras analisadas pode causar problemas no detector e mais ainda em sítios do injetor (MENKISSOGLU-SPIROUDI & FOTOPOULOU, 2004).

Sítios ativos do *liner* (tubo de vidro) do injetor é a principal fonte do efeito de matriz, pois adsorve e, ou, induz a degradação térmica de alguns analitos (ERNEY et al, 1993). Quando as soluções padrão são preparadas no solvente puro e analisadas por cromatografia gasosa, mais sítios ativos do *liner* estão disponíveis para retenção dos analitos. Enquanto que ao preparar padrões no extrato da matriz, ocorre uma competição por esses locais entre os componentes da matriz e os analitos, possibilitando que uma maior quantidade de pesticida esteja disponível para introduzir-se na coluna cromatográfica (SCHENCK & LEHOTAY, 2000). Entretanto, preparar os padrões em extratos brancos, além de aumentar o custo e o tempo da análise, a concentração dos próprios interferentes da matriz pode diferir de uma amostra para outra (RIBANI et al, 2004).

Para o desenvolvimento de um método analítico, os possíveis efeitos de matriz na análise cromatográfica devem ser levados em consideração mesmo para comprovar a ausência ou presença do fenômeno sobre uma longa faixa de concentração do analito na matriz. Para isso, duas séries de soluções padrão foram preparadas, sendo uma em solvente puro e a outra em extratos de amostra de tomate (RIBANI et al, 2004). As curvas analíticas preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz foram comparadas para os pesticidas clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, nas Figuras 1.9 A, B, C, D, respectivamente.

Na Figura 1.9 A, a inclinação da curva analítica preparada em acetonitrila e no extrato da matriz são correspondentes, sugerindo assim que o pesticida clorpirifós não apresentou efeito de matriz, ou seja, a presença dos componentes da matriz não interferiu, significativamente, em sua análise cromatográfica. O clorpirifós é um pesticida mais polar que os piretróides, então, esperavam-se uma maior adsorção deste composto no *liner* do injetor, entretanto isso não ocorreu porque o clorpirifós é mais volátil, permanecendo pouco tempo no injetor para ser adsorvido, sendo analisado mais rapidamente.

No entanto, para os piretróides (Figuras 1.9 B, C, D) os padrões preparados em acetonitrila apresentam uma resposta menor quando comparado aos padrões preparados em extratos da matriz, principalmente para a cipermetrina e deltametrina, pois o aumento do coeficiente angular foi mais expressivo.

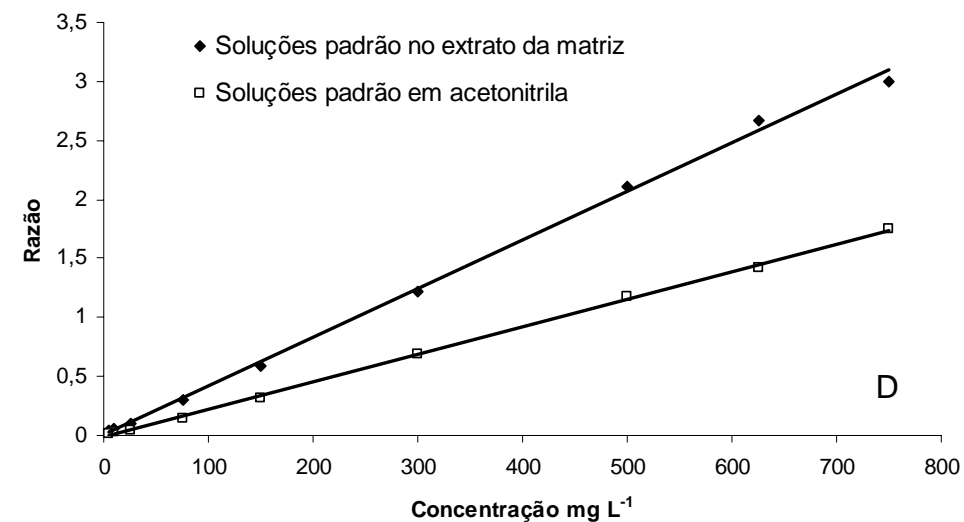
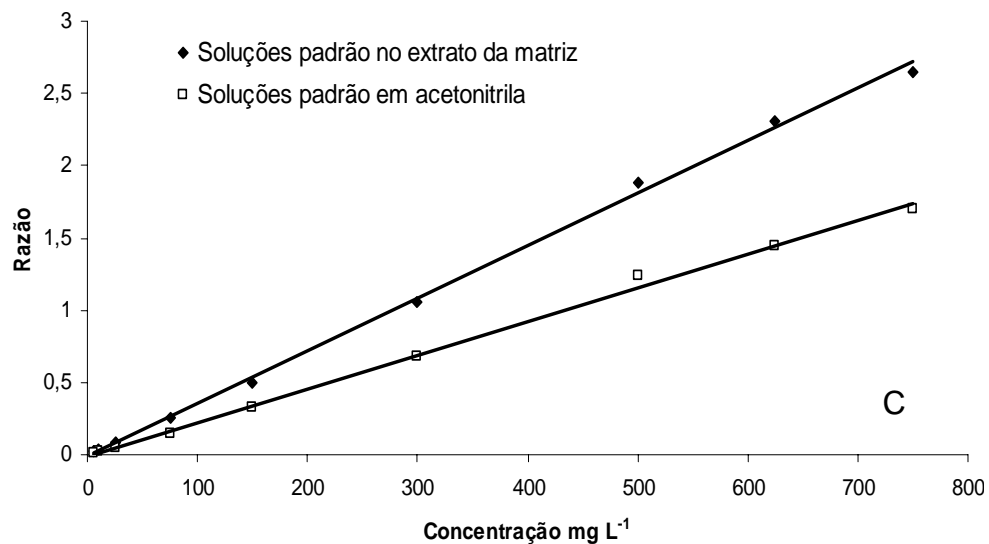
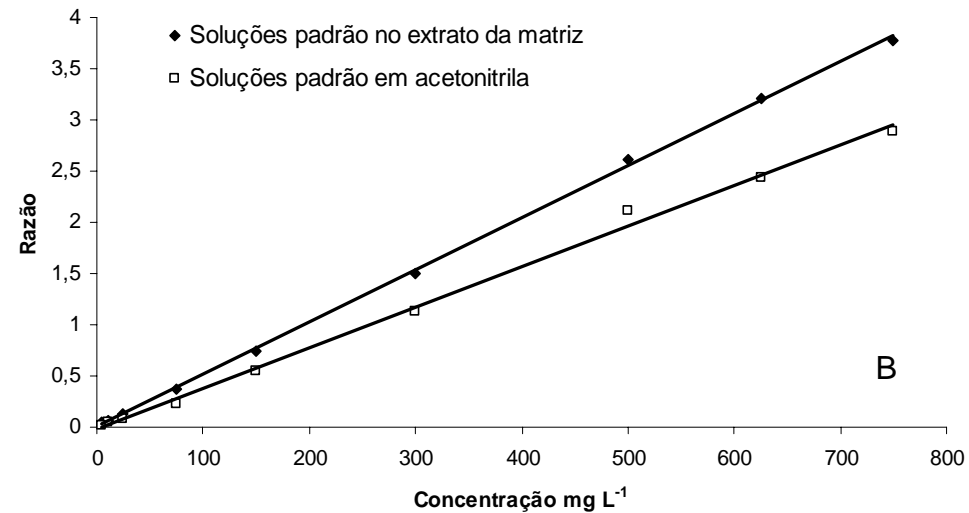
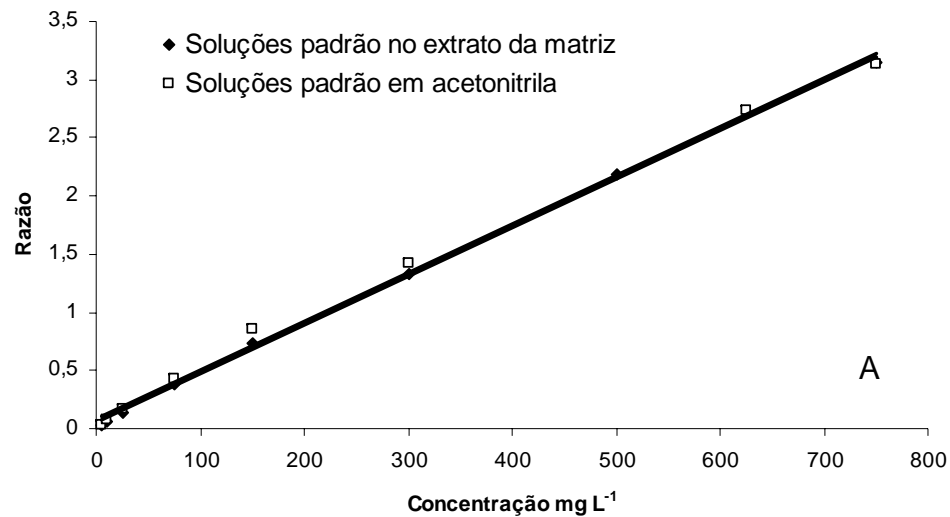


Figura 1.9 – Curvas analíticas preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz isenta de pesticidas: A) clorpirifós, B) λ -cialotrina, C) cipermetrina, D) deltametrina.

Na Figura 1.10 estão apresentadas as taxas de recuperação dos pesticidas, após a ESL-PBT de amostras de tomates fortificadas, quando comparadas com soluções padrões feitas em acetonitrila e em extratos da matriz. Observa-se que ao considerar a interferência dos componentes da matriz, as porcentagens de extração dos pesticidas mostravam-se na realidade próximos a 70%.

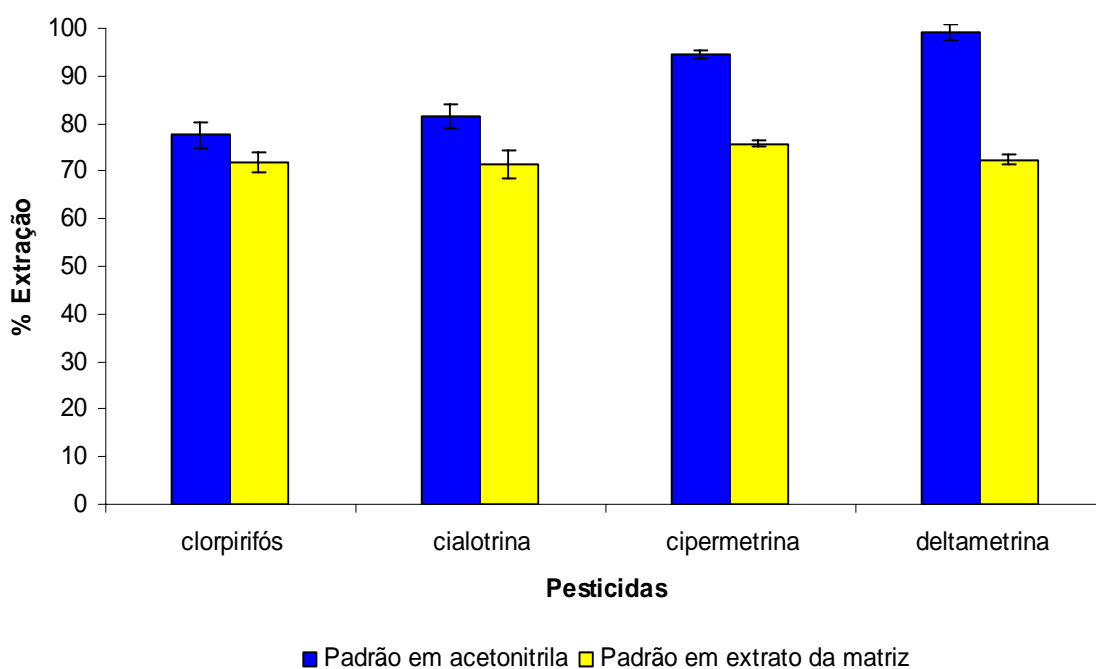


Figura 1.10 – Comparação das porcentagens de extração dos pesticidas (clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina) quando relacionadas com solução padrão preparada em solvente puro (acetonitrila) e quando relacionadas com solução padrão preparada no extrato da matriz e os respectivos desvio-padrão.

Conforme já discutido, os piretróides são mais influenciados pelo efeito de matriz, destacando-se a deltametrina cuja taxa de recuperação que supostamente era cerca de 99% (padrão em acetonitrila), apresentou na realidade uma extração de 72% quando a solução padrão foi preparada na presença dos componentes da matriz .

Já para o clorpirifós era esperada a ausência de efeito de matriz, entretanto as taxas de recuperação para este pesticida ao serem determinadas relacionando com solução padrão preparada em acetonitrila e com solução

padrão preparada no branco, mostraram-se estatisticamente diferentes ao nível de 95% de probabilidade. Embora essa diferença nas porcentagens de extração do clorpirifós não excedeu a 6%, o efeito de matriz mostrou-se significativo. Os dados das análises cromatográficas para o clorpirifós apresentados nas Figuras 1.9 A (ausência de efeito de matriz) e 1.10 (presença do efeito de matriz) foram obtidos em épocas distintas, sendo que as amostras de tomates, o tempo de uso da coluna cromatográfica e do *liner* no injetor, também eram diferentes nas duas situações. Fatores como estes é que dificultam a quantificação exata do efeito de matriz para um dado pesticida.

Outra maneira de avaliar este efeito de matriz é verificar o aumento gradativo da resposta (áreas) na análise cromatográfica. SCHENCK & LEHOTAY (2000) ao estudar o efeito de matriz na análise de organofosforados encontrou dificuldades, pois as respostas mudavam à medida que os componentes da matriz se depositavam no sistema de injeção (*liner*), tornando-se imprevisível.

Para avaliar esta variação das áreas dos pesticidas na análise cromatográfica, solução padrão dos pesticidas, em acetonitrila, foi analisada antes e após injeções sucessivas de extrato obtido da ESL-PBT de amostra de tomates isentas de pesticidas.

Na Figura 1.11 comparou-se a razão (área do pesticida / área do padrão interno) para cada pesticida antes e após a saturação do CG-DCE por componentes da matriz.

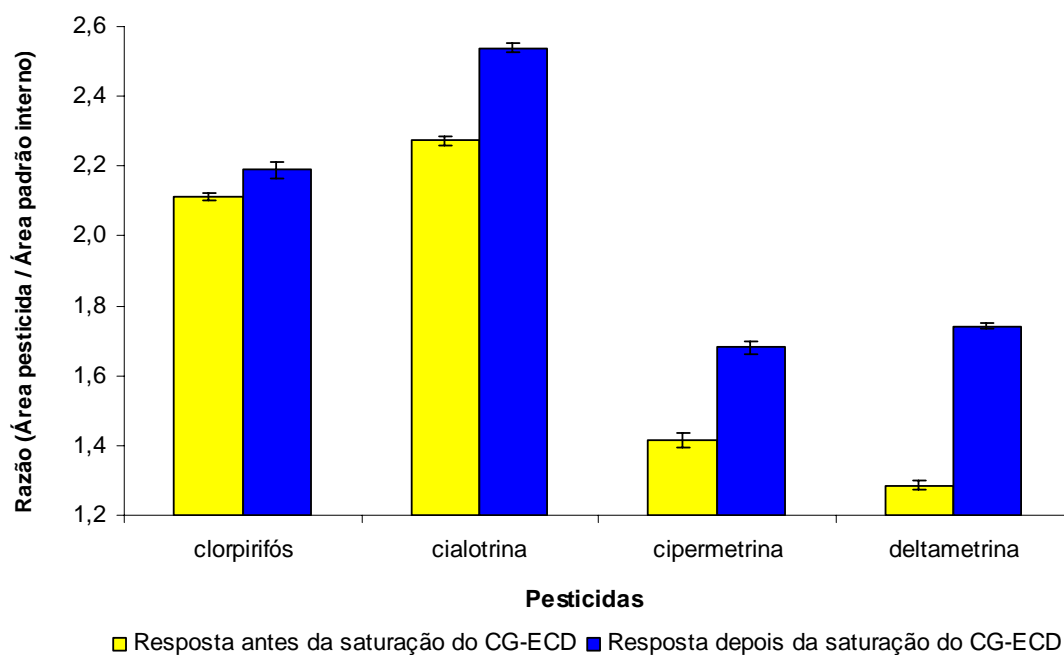


Figura 1.11 – Comparação da razão das áreas (área do pesticida / área do padrão interno) para os pesticidas clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina preparados em acetonitrila antes e após saturar o sistema cromatográfico (CG-DCE) com componentes da matriz tomate (branco).

Observou-se na Figura 1.11, que as respostas de todos os pesticidas aumentaram significativamente após injetar extratos de amostras de tomate. A deltametrina foi o pesticida mais afetado pelos componentes da matriz, pois a resposta deste composto aumentou em aproximadamente 35%. Para os pesticidas cipermetrina, λ -cialotrina e clorpirifós, houve um aumento de 19%, 12% e 4%, respectivamente. Observa-se que esta ordem decrescente de efeito de matriz corresponde exatamente à ordem de retenção dos compostos no sistema cromatográfico (Figura 1.3), ou seja, quanto maior o tempo de retenção do pesticida na análise cromatográfica maior a interferência da matriz. Neste sentido, os piretróides são largamente afetados pelo efeito de matriz devido a sua elevada massa molar, o que dificulta a volatilização destes no injetor e conseqüentemente maior tempo de análise (SANCHEZ-BRUNETE, 2005). Embora o aumento da resposta para o clorpirifós tenha sido de apenas 4%, o efeito de matriz mostrou-se significativo ao nível de 95% de probabilidade pelo teste t.

O efeito de matriz nos resultados pode ser significativo e deve ser determinado cuidadosamente. A exata avaliação do efeito de matriz pode evitar

estimativas errôneas dos teores dos analitos, além de se ter uma técnica mais confiável. Para redução do efeito de matriz é recomendável o uso de curva de calibração preparada em extratos da matriz isenta de pesticidas (RIBANI, 2004), ou a utilização de substâncias protetoras nos padrões preparados em solvente puro (SANCHEZ-BRUNETE et al, 2005). Ou ainda submeter os extratos a novos processos de *clean up*.

1.2.2.5. Eficiência de adsorventes no *clean up* dos extratos obtidos na ESL-PBT de amostras de tomate

Vários estudos sugerem a etapa de *clean up* para reduzirem ou eliminarem co-extrativos das amostras antes da análise cromatográfica (HAJSLOVÁ et al, 1998). Em recentes estudos foi concluído que extensivo *clean up* para várias matrizes vegetais com a combinação de cartuchos de troca iônica e carvão ativado reduzem o efeito de matriz (HAJSLOVÁ et al, 2003). A etapa de *clean up* com carvão ativado é muito útil, principalmente, na remoção de pigmentos da matriz. Entretanto, o extensivo *clean up* pode resultar na perda parcial dos pesticidas e aumentar o tempo de análise e custos (SCHENCK & LEHOTAY, 2000).

Mesmo com resultados satisfatórios no processo de ESL-PBT dos quatro pesticidas em amostras de tomate, observou-se que os extratos possuíam quantidades apreciáveis de pigmentos. No entanto, ao utilizar o detector por captura de elétrons (DCE) ou mesmo o detector por ionização em chama (DIC) não se observava a presença destes compostos nos cromatogramas. Notava-se que nas análises havia um pronunciado efeito de matriz que poderia estar associado à presença destes pigmentos. Com o objetivo de tornar os extratos mais puros avaliou-se o *clean up* desses extratos pelo uso de adsorventes como: florisil, octadecil (C-18), sílica e carvão ativado. Tal processo deveria diminuir a pigmentação dos extratos sem interferir significativamente na recuperação dos pesticidas.

As taxas de recuperação dos pesticidas na ESL-PBT, utilizando quatro adsorventes no *clean up* dos extratos, comparados com padrões em acetonitrila, são mostradas na Figura 1.12.

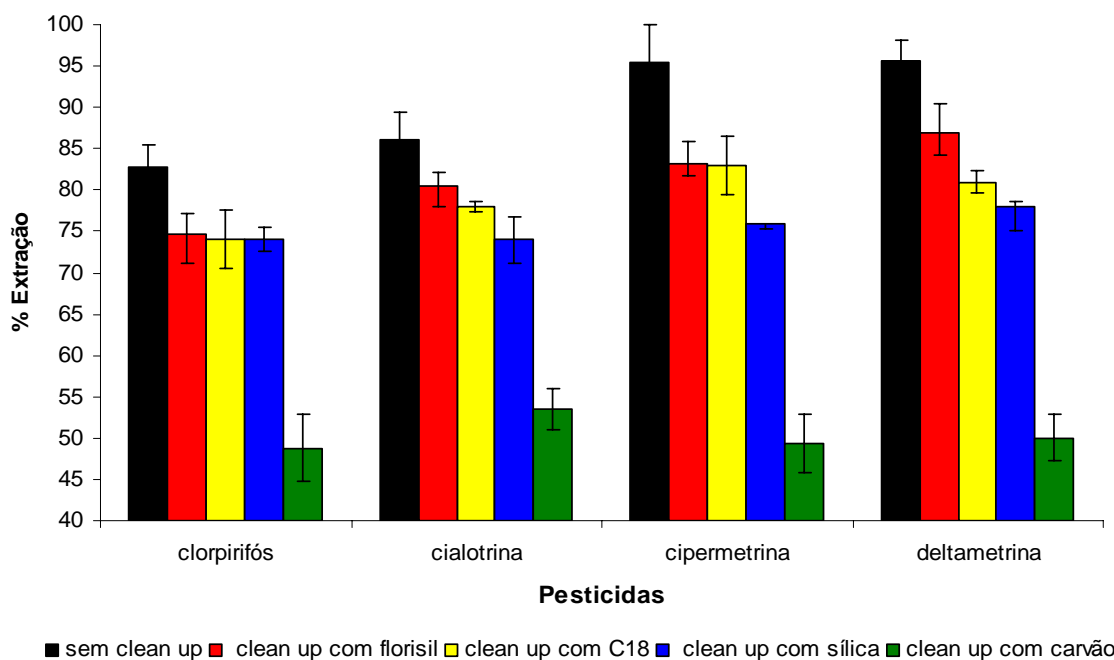


Figura 1.12 – Influência dos adsorventes florisil, octadecil (C-18), sílica e carvão ativado na porcentagem de extração dos pesticidas no *clean up* dos extratos obtidos pela ESL-PBT.

Florisil, octadecil (C-18) e sílica não proporcionaram extratos mais claros, e, além disso, diminuíram a taxa de recuperação dos quatro pesticidas devido à adsorção. Já o carvão ativado possibilitou a obtenção de extratos incolores, porém reduziu as porcentagens de extração de todos os pesticidas para aproximadamente 50 %, devido ao seu alto poder adsorativo (SOJO et al, 1997). Este resultado é semelhante ao encontrado por TORRES *et al* (1997) ao analisar 13 pesticidas em amostras de tomate, usando a extração sólido-líquido seguida por *clean up* com 0,5 g de carvão ativado. Entre os compostos analisados estavam clorpirifós, cipermetrina e deltametrina, encontrando as respectivas porcentagens de extração 61%, 50% e 40%.

Entretanto, a adição de carvão ativado, em menor quantidade, durante o processo de extração mostrou-se mais eficiente na remoção dos componentes indesejáveis da matriz, e afetou, em menor extensão, a taxa de recuperação dos pesticidas clorpirifós, cipermetrina, λ -cialotrina e deltametrina nos extratos. A Figura 1.13 mostra a influência da adição de 0, 5, 10 e 15 mg de carvão ativado, durante a extração, na taxa de recuperação dos pesticidas.

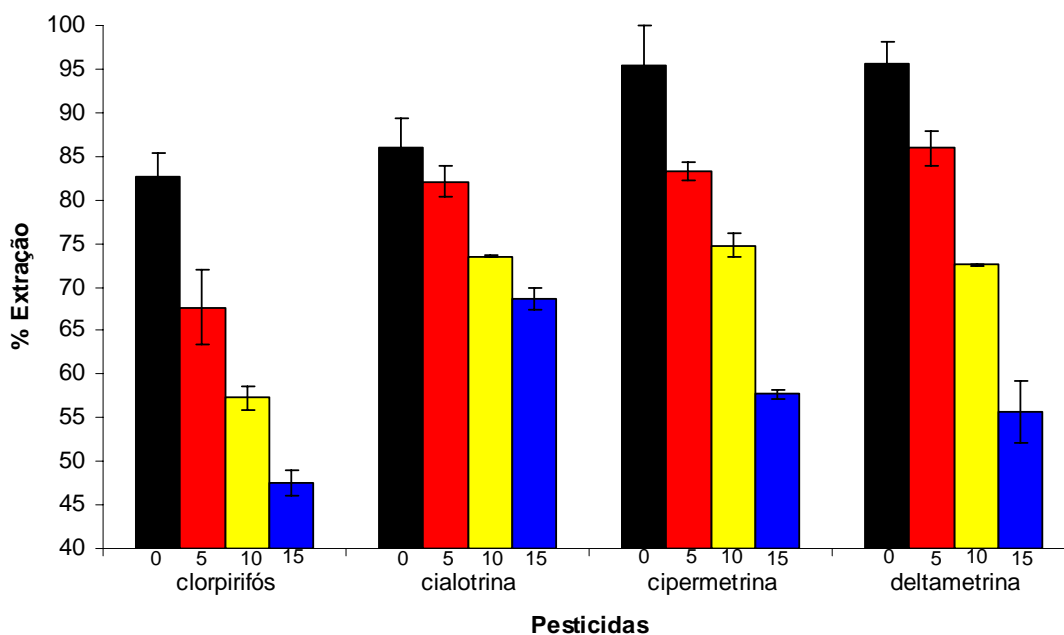


Figura 1.13 – Porcentagens de recuperação dos pesticidas clorpirifós, cipermetrina, λ -cialotrina e deltametrina com a adição de 0, 5, 10 e 15 mg de carvão ativado durante o processo de extração na técnica ESL-PBT.

Observa-se, na Figura 1.13, que à medida que a quantidade de carvão ativado é aumentada nos extratos as porcentagens de extração dos pesticidas diminuem, principalmente para o clorpirifós. Quantidades superiores a 15 mg do adsorvente, embora forneçam extratos livres de pigmentos, tornam a técnica inviável devido à adsorção acentuada dos pesticidas, reduzindo a taxa de recuperação dos piretróides para quantidades inferiores a 70% e do clorpirifós para cerca de 50%.

Resultados mais satisfatórios foram encontrados utilizando-se 10 mg do carvão ativado, pois a taxa de recuperação dos piretróides foi próxima a 74 % e os extratos apresentaram-se claros. Estes resultados são semelhantes aos apresentados na Figura 1.10 na análise do efeito de matriz, em que a extração dos piretróides diminuiu para cerca de 70% quando a interferência dos componentes da matriz foi levada em consideração. Entretanto, a adição de 10 mg de carvão ativado reduziu expressivamente a extração do clorpirifós para quantidades inferiores a 60%.

Já a adição de 5 mg de adsorvente foi insuficiente para remover compostos da matriz, embora tenha possibilitado extração dos piretróides em taxas superiores a 80% e do clorpirifós para 68% .

A Figura 1.14 mostra o efeito da adição do carvão ativado (0, 5, 10, 15 mg) na remoção dos componentes da matriz, principalmente o licopeno, responsável pela coloração vermelha do tomate, analisados por espectrofotometria.

O licopeno e demais pigmentos presentes no extrato da matriz, absorvem, na análise espectrofotométrica, na região de 380 a 500 nm (CARVALHO, 2005), desta forma, observa-se pela Figura 1.14 que a adição do adsorvente reduz significativamente o teor de carotenóides. Nos comprimentos de onda entre 340 e 390 nm, há absorção de energia de compostos polifenólicos aromáticos, os flavonóides, que são antioxidantes presentes no tomate (SIMONETTI, 2005). Estes compostos são removidos, apenas, na presença de quantidades mais expressivas do adsorvente (10 e 15 mg).

Assim, no desenvolvimento da metodologia da ESL-PBT para os piretróides cipermetrina, λ -cialotrina e deltametrina em amostras de tomate, o *clean up* é convenientemente realizado com a adição de 10 mg de carvão ativado durante o preparo da amostra, fornecendo extrações superiores a 70 %, além de apresentar remoção significativa dos componentes da matriz avaliada pela análise espectrofotométrica.

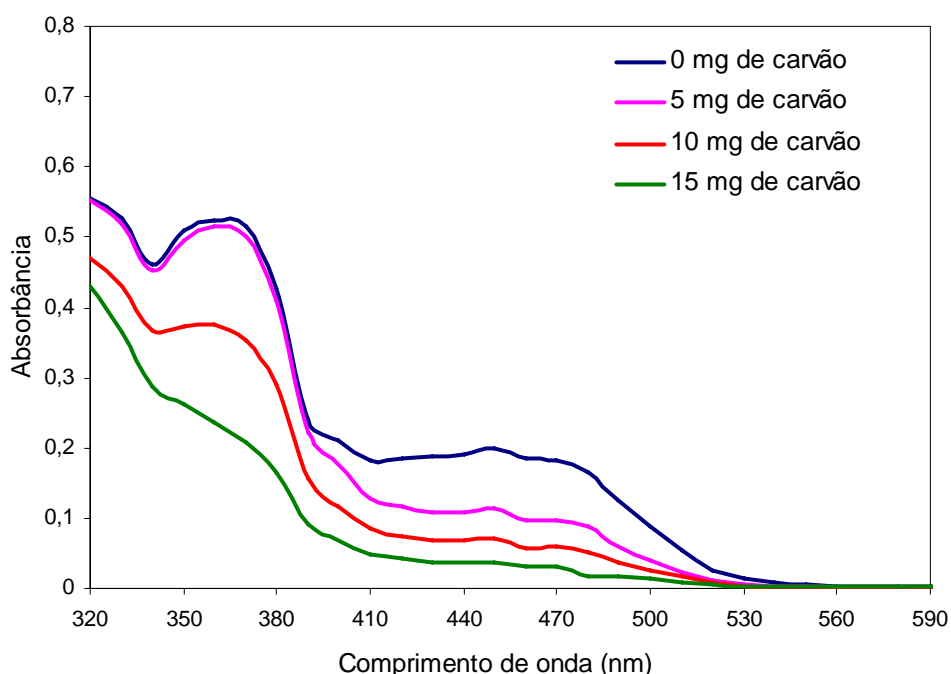


Figura 1.14 – Espectros de absorção dos extratos obtidos a partir da ESL-PBT de amostras de tomate isenta de pesticidas com a adição de 0, 5, 10, 15 mg de carvão ativo.

Embora os pigmentos não sejam detectados pelo detector de captura de elétrons, o estudo do *clean up* dos extratos ainda é relevante no sentido de preservar o sistema cromatográfico e diminuir o efeito de matriz provocado pelos constituintes da amostra e os seus produtos de degradação.

1.2.3. Metodologia otimizada

A metodologia de ESL-PBT aplicada na extração dos pesticidas clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina nas amostras de tomate foi otimizada por meio do planejamento de misturas associada às análises univariadas do efeito da força iônica, influência do mecanismo de agitação e etapa de *clean up*. Entretanto para a validação da ESL-PBT para análises de pesticidas em amostras de tomate, optou-se por não utilizar a etapa de *clean up* com 10 mg de carvão ativado, devido à redução significativa da porcentagem de extração do clorpirifós. Além disso, a alteração da força iônica da mistura extratora mostrou-se desnecessária. Apesar dos resultados apresentarem efeito de matriz, este não foi levado em consideração durante a etapa de validação, para não aumentar o custo e o tempo de análises. Desta forma, a metodologia otimizada aplicada na validação ficou estabelecida da seguinte forma:

Extração de 4,0000 g de tomate, previamente fortificado com 1,25 mg kg⁻¹, com 8,0 mL de acetonitrila, 0,5 mL de água e 1,5 mL de acetato de etila seguida de agitação por 1 minuto em ultra-som. Após a agitação as amostras foram deixadas no freezer a - 20 °C por 12 horas. Após o congelamento as amostras foram filtradas na presença de sulfato de sódio anidro. Os extratos foram recuperados em balão volumétrico de 10,0 mL e armazenados no freezer para posterior análise por cromatografia gasosa.

A metodologia otimizada foi aplicada tanto na análise dos pesticidas em amostra da polpa do tomate assim como em amostra do tomate inteiro, proporcionando valores semelhantes na taxa de recuperação. O tomate verde, embora seu consumo *in natura* seja mais restrito, também apresentou taxas de recuperação dos pesticidas na ESL-PBT similares ao tomate maduro, diferenciando apenas na coloração do extrato.

1.2.4. Validação do método analítico

Para avaliar o desempenho do método analítico, vários parâmetros foram considerados, segundo recomendações do INMETRO (2003): seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão.

1.2.4.1. Seletividade

Para avaliar a seletividade do método de extração e análise por cromatografia compararam-se os cromatogramas do extrato obtido na ESL-PBT de uma matriz de tomate isenta dos pesticidas (Figura 1.15 A) com os extratos de duas amostras de tomate fortificadas com os compostos em estudo (Figura 1.15 B).

A amostra de tomate, apesar de possuir uma composição complexa, não apresentou interferentes nos mesmos tempos de retenção dos compostos analisados o que torna a metodologia seletiva. Esta seletividade está também relacionada com a seletividade do detector aos compostos halogenados.

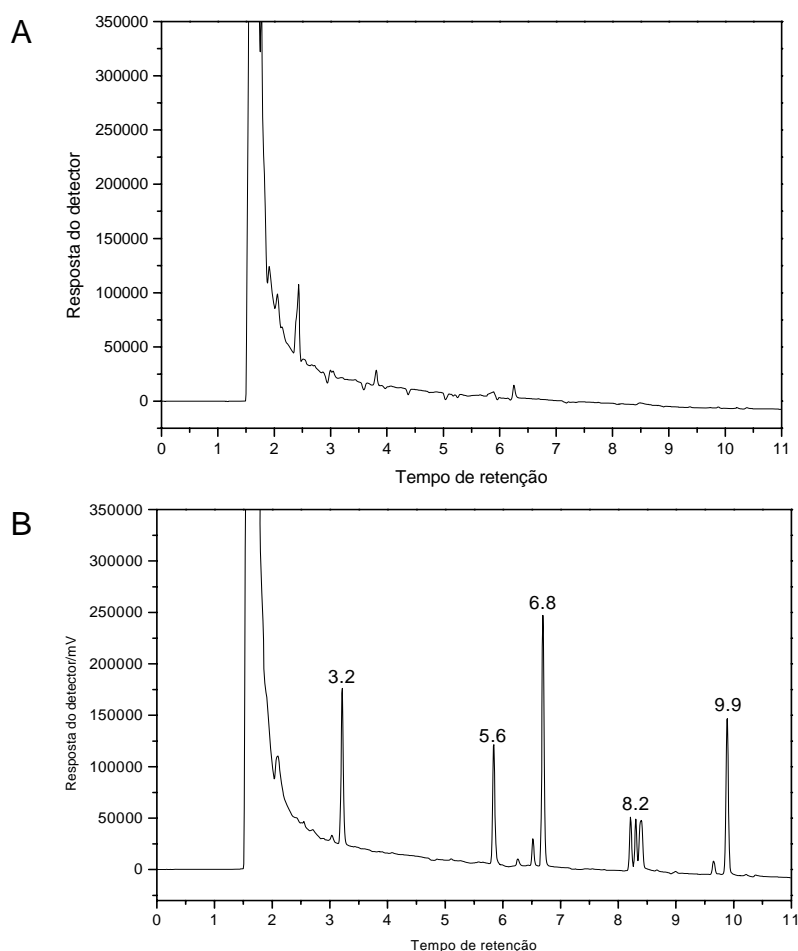


Figura 1.15 – A) Cromatograma do extrato obtido da matriz isenta dos pesticidas e B) Cromatograma da amostra fortificada com $500 \mu\text{g L}^{-1}$ dos pesticidas ($t_R = 3,2$ min: clorpirifós, $t_R = 5,6$ min: bifentrina, $t_R = 6,8$ min: cialotrina, $t_R = 8,2$ min: cipermetrina, $t_R = 9,9$ min: deltametrina).

1.2.4.2. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) para métodos cromatográficos, representa a menor quantidade da substância estudada que pode ser diferenciada do ruído do sistema com segurança, entretanto a detecção não implica que o analito seja quantificável. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito que pode ser quantificada com exatidão (INMETRO, 2003).

O limite de detecção pode ser calculado por meio dos parâmetros da curva analítica:

$$LD = 3,3 \times s / S$$

Sendo que:

s = estimativa do coeficiente linear da curva analítica

S = inclinação ou coeficiente angular da curva analítica

Para o cálculo do limite de quantificação, foram adotados critérios semelhantes ao limite de detecção, ou seja:

$$LD = 10 \times s / S$$

Para o cálculo das estimativas dos LD e LQ, foram construídas curvas analíticas utilizando soluções padrão contendo os pesticidas nas concentrações de 12, 8, 6, 4 e 2 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os coeficientes linear e angular das curvas analíticas, bem como os valores de LD e LQ obtidos para os compostos estão na Tabela 1.8.

Tabela 1.8 – Estimativa dos coeficientes linear (s) e angular (S) das curvas analíticas, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Pesticidas	s	S	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r
Clorpirifós	0,0006	0,0049	0,40	1,2	0,9906
λ -cialotrina	0,0032	0,0031	3,4	10,3	0,9965
Cipermetrina	0,003	0,003	3,3	10,0	0,9954
Deltametrina	0,0003	0,0021	0,47	1,4	0,9986

Verificou-se que os valores dos limites de detecção obtidos para análise dos compostos clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina utilizando CG – DCE estão entre 0,40 e 3,4 $\mu\text{g L}^{-1}$. Já o limite de quantificação obtido está entre 1,2 e 10,3 $\mu\text{g L}^{-1}$. VIEIRA et al (2007), analisando os piretróides λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em água e solo por CG-DCE obteve valores para o LD entre 1,1 e 2,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ e LQ entre 3,3 e 9,6 $\mu\text{g L}^{-1}$.

1.2.4.3. Curvas analíticas e linearidade de resposta do detector

As curvas analíticas foram construídas utilizando o método da padronização interna, relacionando a concentração do pesticida com a razão das áreas (área do pesticida / área do padrão interno). Pequenas variações na temperatura, no volume da amostra ou possíveis erros nas injeções manuais não interferem acentuadamente nos resultados, quando utilizado a padronização interna (RIBANI 2004).

O padrão interno escolhido é um piretróide, que não reage com os componentes da matriz, não degrada e possui tempo de retenção diferente, na análise cromatográfica, aos pesticidas analisados e compostos da matriz. Os experimentos revelaram que a bifentrina é um eficiente padrão interno, pois praticamente não apresentou efeito de matriz, mantendo constante sua área no decorrer de todas as análises cromatográficas.

Na Tabela 1.9 estão as equações de regressão bem como os respectivos coeficientes de correlação (r), obtidos a partir da regressão linear dos dados. Os coeficientes angular e linear da curva da cipermetrina e deltametrina foram muito semelhantes proporcionando superposição das mesmas.

Tabela 1.9 – Equações das retas e os respectivos coeficientes de correlação

Pesticidas	Equações	r
clorpirifós	$Y = 0,0042x + 0,0929$	0,998
λ -cialotrina	$Y = 0,0040x - 0,0217$	0,998
cipermetrina	$Y = 0,0023x - 0,0083$	0,999
deltametrina	$Y = 0,0023x - 0,0144$	0,999

Os valores dos coeficientes de correlação encontrados estão de acordo com as normas da ANVISA que recomenda valores superiores a 0,99. Assim, o detector por captura de elétrons apresenta linearidade de resposta na faixa de concentração de 5 a 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os pesticidas clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina.

1.2.4.4. Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade dos resultados e precisão intermediária.

A repetitividade foi estudada pelo cálculo da estimativa do coeficiente de variação (CV) de sete repetições do procedimento otimizado da extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura para os pesticidas clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina.

Os resultados do coeficiente de variação obtidos para a amostra de tomate variaram entre 2,13% e 6,08 % (Tabela 1.10), tendo o organofosforado clorpirifós apresentado maior dispersão dos resultados. Entretanto esses resultados demonstram excelente repetitividade, uma vez que os coeficientes de variação se encontram bem abaixo do recomendado para amostras complexas. Segundo RIBANI et al. (2004), são aceitáveis CV de até 20% para amostras complexas, como por exemplo, o tomate.

Tabela 1.10 – Porcentagem de recuperação (% R), coeficiente de variação (CV) e desvio padrão (DP) obtido após sete extrações dos pesticidas em amostras de tomate

Pesticidas	R (%)	DP	CV (%)
Clorpirifós	79,04	4,81	6,08
λ -cialotrina	79,37	3,71	4,68
Cipermetrina	88,44	1,91	2,13
Deltametrina	91,94	3,36	3,65

Já a precisão intermediária refere-se às variações ocorridas dentro de um laboratório, quando alguns fatores são alterados, tais como: analista, equipamentos, período (tempo), etc. Neste trabalho, a precisão intermediária do método foi verificada pelas porcentagens de recuperação dos pesticidas e respectivos coeficientes de variação (CV) analisados em três dias diferentes. As análises foram realizadas aos 7 e 30 dias após o primeiro teste, pelo mesmo analista, mesmo equipamento, etc. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 1.11.

Tabela 1.11 – Porcentagem de recuperação (% R) e coeficiente de variação (CV) obtidos após a análise em dias diferentes, pelo mesmo analista

Dias	clorpirifós		λ -cialotrina		cipermetrina		deltametrina	
	R(%)	CV(%)	R (%)	CV(%)	R(%)	CV(%)	R(%)	CV(%)
1 Dia	83,00	3,91	86,59	3,67	89,53	1,87	97,93	3,55
7 Dias	81,63	2,34	82,66	3,28	90,05	2,63	92,41	2,57
30 Dias	82,43	1,53	84,53	1,20	92,09	1,80	91,82	0,56

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1.11, pode-se afirmar que a técnica de extração em estudo apresenta porcentagens de recuperação estatisticamente iguais (ao nível de 95 % de probabilidade) em diferentes dias, para cada pesticida extraído no tomate. Além disso, os valores dos coeficientes de variação foram baixos variando de 0,56 a 3,91 para todos os princípios ativos.

1.2.4.5. Exatidão

A exatidão da ESL-PBT foi avaliada realizando ensaios de recuperação, em que a porcentagem de extração foi calculada adicionando os pesticidas em concentrações próximas à 1, 2, 4 e 10 vezes o limite de quantificação (LQ). Assim, os ensaios de recuperação foram realizados extraíndo-se as substâncias de interesse, presentes na matriz de tomate, conforme o procedimento otimizado, obtendo-se no extrato final 10, 20, 40 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estes valores correspondem a 0,025; 0,050; 0,10 e 0,25 mg kg^{-1} de tomate, respectivamente.

Os resultados obtidos para extração dos pesticidas clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina no tomate, bem como os respectivos coeficientes de variação estão apresentados na Tabela 1.12.

Tabela 1.12 – Porcentagem de recuperação (%R) e coeficiente de variação (CV) obtidos após extração da amostra de tomate, fortificadas pelos pesticidas em quatro concentrações diferentes

Concentração		clorpirifós		λ -cialotrina		cipermetrina		deltametrina	
($\mu\text{g L}^{-1}$)	mg kg^{-1}	% R	CV	% R	CV	% R	CV	% R	CV
10	0,025	81,78	1,77	79,32	2,22	-	-	93,55	0,66
20	0,05	82,08	3,06	85,55	2,31	97,09	0,88	91,88	0,48
40	0,1	79,44	2,44	86,73	4,20	92,20	4,03	90,80	0,97
100	2,5	82,40	3,52	87,06	4,39	95,11	1,38	91,18	0,58

Os resultados apresentados na Tabela 1.12, para a extração dos pesticidas em amostras de tomate são estatisticamente equivalentes entre si (ao nível de 95 % de probabilidade), mostrando a exatidão do método.

Embora a extração dos três isômeros da cipermetrina tenha apresentado boa taxa de recuperação, nas concentrações de 20, 40 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, observou-se que em concentrações inferiores a 40 $\mu\text{g L}^{-1}$, o terceiro isômero da cipermetrina não pode ser quantificado, pois um interferente da matriz é extraído e possui mesmo tempo de retenção do terceiro isômero. Este interferente somente foi observado em concentrações muito baixas da cipermetrina, pois nas concentrações de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ou no extrato da matriz isento de pesticidas (branco), não foi perceptível a sua interferência. A presença deste composto não faz perder a validade do método de extração para a cipermetrina, pois a taxa de recuperação, mostrada na Tabela 1.12 para as concentrações de 20 e 40 $\mu\text{g L}^{-1}$, refere-se apenas aos dois primeiros isômeros da cipermetrina.

A análise cromatográfica de analitos presentes em amostras complexas e em níveis muito baixos pode sofrer interferências que afetam significativamente os resultados. Por exemplo, na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, os sinais detectados da cipermetrina após a ESL-PBT não puderam ser diferenciados dos ruídos, impossibilitando sua quantificação. Assim, até 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi possível quantificar a cipermetrina pela metodologia desenvolvida. Já o clorpirifós, λ -cialotrina e deltametrina foram quantificados em concentrações de até 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ com segurança.

Considerando o limite máximo de resíduo permitido (LMR), determinado pela ANVISA para os pesticidas, λ -cialotrina ($0,05 \text{ mg kg}^{-1}$), cipermetrina ($0,10 \text{ mg kg}^{-1}$) e deltametrina ($0,03 \text{ mg kg}^{-1}$), verifica-se que a metodologia otimizada possibilita a extração e quantificação dos pesticidas em quantidades inferiores às estabelecidas, considerando as respectivas taxas de recuperação. Por exemplo, a cipermetrina não é quantificada em concentrações muito baixas após ESL-PBT e análise por CG, entretanto, observa-se que o limite de detecção do método ($0,05 \text{ mg kg}^{-1}$) é inferior ao LMR ($0,10 \text{ mg kg}^{-1}$).

1.2.5. Determinação dos pesticidas clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em amostras comerciais de tomate

A técnica de ESL-PBT otimizada foi aplicada em três amostras de tomates, obtidas em comércios da cidade de Viçosa-MG originários de diferentes fornecedores.

Nas amostras analisadas, não foi constatada a presença de resíduos de nenhum dos compostos: clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina.

CAPÍTULO 2

DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA

2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1. Preparo de soluções padrão de pesticidas

As soluções empregadas neste trabalho foram preparadas pela solubilização de padrões de clorpirifós (99,0 % m/m - Chem Service), cipermetrina (92,4% m/m – Chem Service), λ -cialotrina (86,5% m/m - Syngenta) e deltametrina (99,0 % m/m – Chem Service), em acetonitrila (Mallickrodt / HPLC). Soluções estoque de 500,0 mg L⁻¹ foram preparadas para cada padrão e armazenadas a baixa temperatura. A partir de diluição das soluções estoque em acetonitrila, foi preparado uma solução de trabalho contendo os quatros pesticidas em concentrações de 10,0 mg L⁻¹.

Uma segunda solução de concentração igual a 10,0 mg L⁻¹, utilizada como padrão interno, foi preparado pela solubilização de padrão de bifentrina (92,2 % m/m – FMC do Brasil) em acetonitrila.

2.1.2. Preparo de amostras de tomate hidropônico fortificadas

Amostras de tomate (aproximadamente 3 a 4 unidades) foram trituradas em processador caseiro e quantidades de polpa iguais a 0,5000 g foram fortificadas com 50,0 μL de solução de trabalho contendo os quatro pesticidas na concentração de 10,0 mg L^{-1} . As amostras contaminadas (1,00 mg kg^{-1}) foram deixadas por aproximadamente três horas em recipiente aberto para evaporação do solvente.

2.1.3. Otimização da técnica de extração Dispersão da Matriz em Fase Sólida (DMFS)

A técnica de extração dispersão da matriz em fase sólida foi otimizada para a extração dos pesticidas clorpirifós, cipermetrina, λ -cialotrina e deltametrina em amostras de tomate. Após a extração, as concentrações dos analitos foram determinadas por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons. Os experimentos realizados na otimização são descritos nos itens 2.1.3.1, 2.1.3.2, 2.1.3.3.

2.1.3.1. Extração dos pesticidas em tomate por DMFS – Técnica geral

Amostras de tomates, 0,5000 g, foram colocadas em cápsula de porcelana e fortificadas. Foram acrescentados 0,5000 g de adsorvente e, em seguida, macerou-se a mistura até a completa dispersão da amostra. A mistura (amostra + adsorvente) na proporção de 1:1 foi transferida para uma coluna de polietileno (cartucho) de 10 mL contendo 1,0000 g de Na_2SO_4 anidro retido por lã de vidro.

O cartucho foi adaptado a um sistema a vácuo conforme a Figura 2.1.

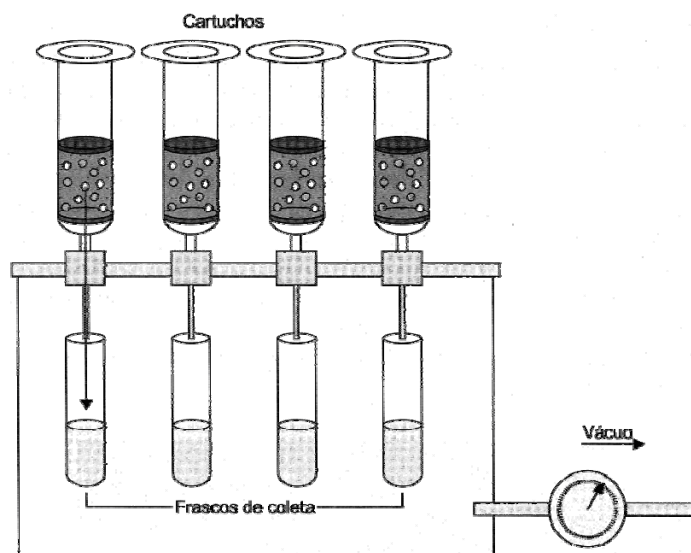


Figura 2.1 – Representação da eluição dos extratos na dispersão da matriz em fase sólida em cartuchos de polietileno.

Adicionaram-se 10,0 mL de solvente (fração 1) ao cartucho em dois volumes iguais (5,0 mL + 5,0 mL). O fluxo foi ajustado a uma vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, aproximadamente. Ao extrato coletado acrescentou-se $50,0 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de padrão interno (bifentrina) a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$. Evaporou-se o solvente sob corrente de ar e o extrato foi recuperado em 1,0 mL de acetonitrila para análise por cromatografia gasosa.

Ao mesmo cartucho foi adicionado novamente 10,0 mL do mesmo eluente (5,0 mL + 5,0 mL) e coletados em outro frasco de vidro (fração 2), para avaliar o volume de solvente necessário para extrair os pesticidas do cartucho.

2.1.3.2. Avaliação do adsorvente e eluente para a técnica de extração DMFS

O procedimento descrito no item 2.1.3.1 foi empregado para avaliar a influência de quatro adsorventes e dois eluentes na porcentagem de recuperação dos pesticidas e na remoção de componentes da matriz, como mostrado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Adsorventes e eluentes avaliados para otimização da DMFS

Ensaio	Adsorventes	Eluentes
1 e 2	Sílica	Acetato de etila
3 e 4	Sílica	Hexano: Acetona (9:1)
5 e 6	Florisil	Acetato de etila
7 e 8	Florisil	Hexano: Acetona (9:1)
9 e 10	C-18	Acetato de etila
11 e 12	C-18	Hexano: Acetona (9:1)
13 e 14	C-8	Acetato de etila
15 e 16	C-8	Hexano: Acetona (9:1)

Os ensaios foram realizados em duplicatas. Para cada combinação de adsorvente e eluente foi preparado um branco (extrato da matriz isenta de pesticidas).

2.1.3.3. Planejamento Fatorial

Usando o adsorvente florisil que melhores resultados apresentaram e o solvente mais adequado, acetato de etila, foi preparado um planejamento fatorial com o objetivo de obter extratos mais puros e maiores taxas de recuperação.

Para extração dos quatro pesticidas em tomate foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 com o objetivo de avaliar o comportamento de três fatores: (1) proporção adsorvente/amostra, (2) presença de co-coluna e (3) auxílio do banho ultra-sônico na extração. Cada fator foi estudado em dois níveis (Tabela 2.2). A co-coluna representa uma camada de adsorvente (0,5000 g) colocada previamente dentro do cartucho para auxiliar no *clean up* dos extratos, retendo componentes da matriz. Neste trabalho foi escolhida a sílica como co-coluna.

Como o fatorial em questão envolve 3 fatores com dois níveis cada um, o planejamento requer 8 experimentos. Em cada ensaio foram feitas duas repetições totalizando 16 experimentos.

Os sinais empregados (-) e (+) indicam níveis dos fatores nos ensaios. As respostas usadas para avaliar os efeitos dos fatores neste planejamento

fatorial foram as porcentagens de recuperação obtidas para cada um dos pesticidas após extração nas amostras de tomates.

Tabela 2.2 – Planejamento fatorial 2^3 para amostras de tomate fortificadas

Ensaio	Fatores codificados			Fatores originais		
	F(1)	F(2)	F(3)	Adsorvente/ Amostra (1)	Co-coluna (2)	Banho ultra-sônico (3)
1 e 2	-	-	-	1:1	sem	sem
3 e 4	+	-	-	2:1	sem	sem
5 e 6	-	+	-	1:1	com	sem
7 e 8	+	+	-	2:1	com	sem
9 e 10	-	-	+	1:1	sem	com
11 e 12	+	-	+	2:1	sem	com
13 e 14	-	+	+	1:1	com	com
15 e 16	+	+	+	2:1	com	com
Branco	+	+	+	2:1	com	com

Para otimizar a extração dos pesticidas clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina por DMFS, os ensaios foram delineados da seguinte maneira:

Em cápsula de porcelana foi adicionada 0,5000 g de amostra de tomate hidropônico, previamente fortificada (item 2.1.3.1.). Adicionou-se 0,5000 ou 1,0000 g do adsorvente florisil correspondentes aos níveis (-) e (+), respectivamente (Tabela 2.2). Triturou-se a mistura até completa dispersão da matriz, sendo transferida, em seguida, para um cartucho contendo Na_2SO_4 anidro e uma co-coluna com 0,5000 g de sílica, caso o ensaio correspondesse ao nível (+) do planejamento. Foram adicionados 5,0 mL de solvente extrator ao cartucho e levado ao banho ultra-sônico por 10 minutos. Esta última etapa foi realizada somente para os ensaios pertencentes ao nível (+) deste fator. Posteriormente, foi realizada a eluição com mais 5,0 mL de solvente, e coletadas em frascos de vidro. Adicionaram-se 50,0 μL de padrão interno (bifentrina) a 10,0 mg L^{-1} . O solvente foi evaporado sob corrente de ar, e o extrato recuperado em 1,0 mL de acetonitrila. O mesmo procedimento nos níveis superiores (+) dos três fatores foi realizado para uma amostra de tomate isenta de pesticidas (branco), para verificar ausência de interferentes nos tempos de retenção dos pesticidas.

2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1. Avaliação de adsorventes e eluentes para a técnica de extração DMFS

A escolha do solvente adequado é a etapa determinante na eficiência da extração dos pesticidas em amostras de tomate, e no procedimento de *clean up* dos extratos na dispersão da matriz em fase sólida. Alguns trabalhos da literatura têm relatado o uso do acetato de etila e da mistura de hexano: acetona (9:1) como eluentes eficientes na extração de pesticidas (LING & HUANG, 1995).

Entretanto, é importante destacar que o efeito do solvente depende das características físicas do adsorvente utilizado na dispersão da amostra. Por isso, foram avaliados quatro adsorventes de polaridades distintas na DMFS, sendo o florissil (silicato de magnésio) e a sílica os mais polares, e o octadecil (C-18) e octil (C-8) os de menor polaridade. Os resultados obtidos na extração dos pesticidas variando os quatro adsorventes com os dois eluentes são mostrados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Taxa de recuperação dos pesticidas (% R) e respectivos coeficientes de variação (CV), na extração por DMFS

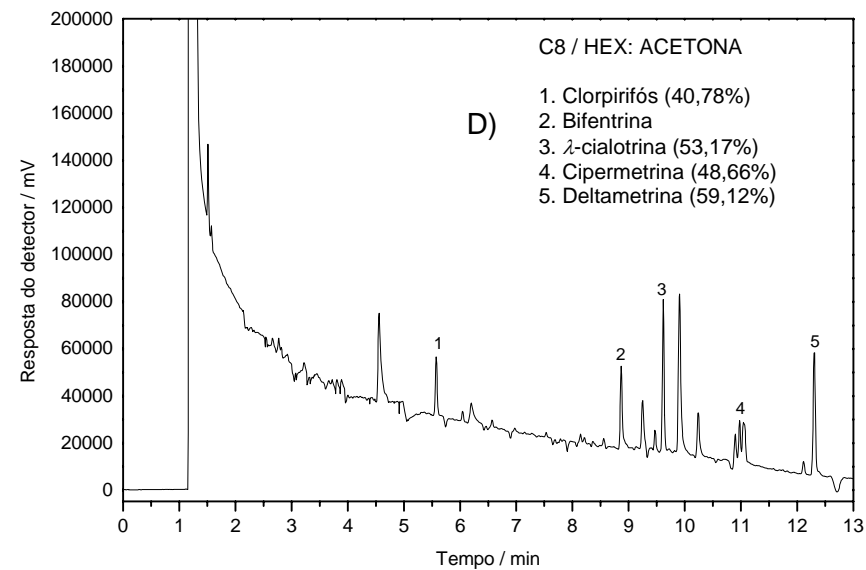
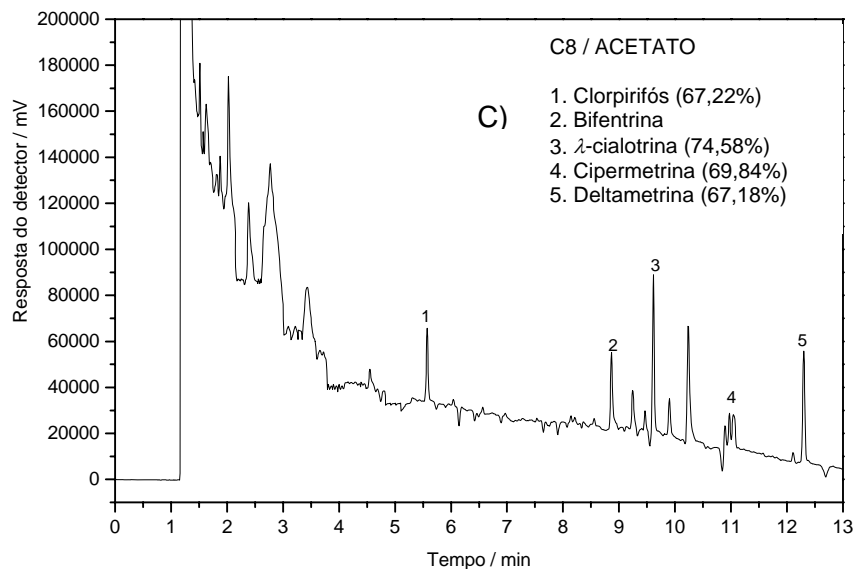
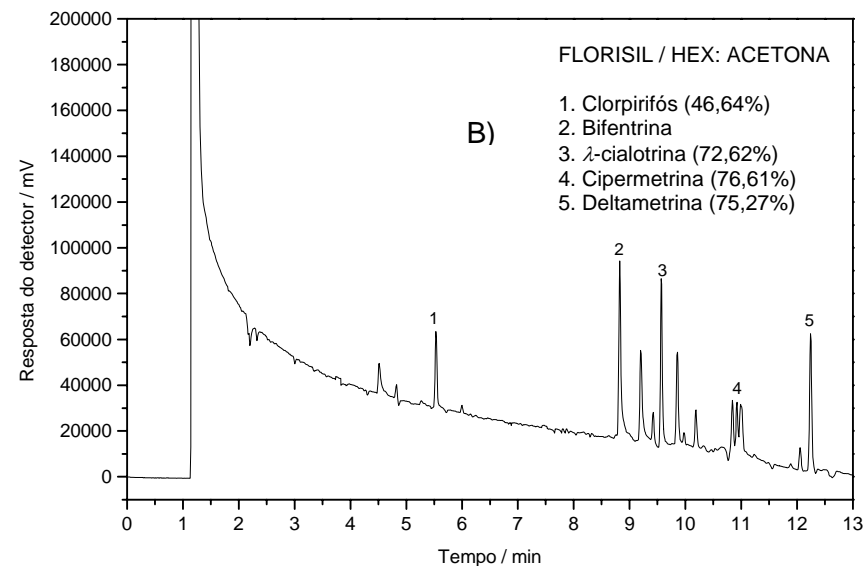
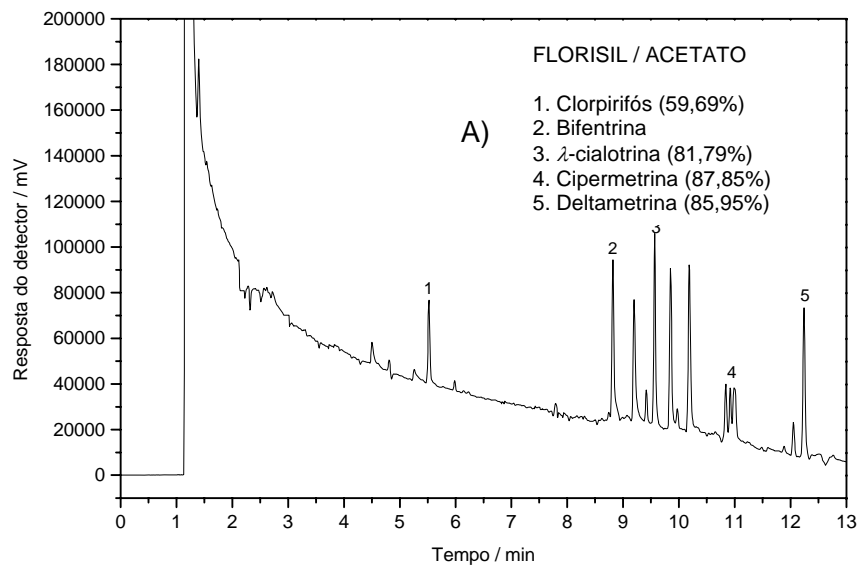
Ensaio	Adsorvente / Eluente	Pesticidas							
		Clorpirifós		λ -cialotrina		Cipermetrina		Deltametrina	
		R(%)	CV(%)	R(%)	CV(%)	R(%)	CV(%)	R(%)	CV(%)
1 e 2	Sílica/Acetato	54,35	7,78	55,23	0,63	54,23	1,98	53,97	0,87
3 e 4	Sílica/Hex:Acet	63,81	11,58	50,12	6,73	50,62	3,36	48,17	1,76
5 e 6	Florisil/Acetato	59,69	6,45	81,79	3,84	87,85	3,86	85,95	4,17
7 e 8	Florisil/Hex:Acet	46,64	10,50	72,62	10,36	76,61	4,00	75,27	9,04
9 e 10	C18/Acetato	21,98	8,01	51,29	10,55	58,21	5,06	56,29	9,29
11 e 12	C18/Hex:Acet	29,43	12,01	44,61	2,26	41,25	8,12	42,66	3,32
13 e 14	C8/Acetato	67,22	10,27	74,58	2,81	69,84	3,72	67,18	1,90
15 e 16	C8/Hex:Acet	40,78	8,93	53,17	7,05	48,66	4,47	59,12	0,15

O uso do acetato de etila como eluente proporcionou as maiores taxas de extração dos piretróides (λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina) em relação à mistura hexano: acetona (9:1), para os quatro adsorventes. Destaca-se como adsorvente o florisil, que proporcionou melhores porcentagens de recuperação dos pesticidas. Os piretróides interagem fracamente com a superfície do florisil devido ao seu acentuado caráter hidrofóbico, e por isso o acetato de etila solubilizou estes pesticidas mais facilmente (LING e HUANG, 1995).

Verificou-se que as taxas de recuperação dos piretróides foram superiores as encontradas para o clorpirifós. Este resultado foi diferente do observado por (TORRES et al, 1997), que encontrou maiores valores de extração para organofosforados em tomate, usando o adsorvente C-18 e acetato de etila como eluente.

O C-18 forneceu os resultados mais baixos de extração para os piretróides, quando eluídos com a mistura hexano: acetona (9:1). Isso pode ser explicado pela forte interação dos pesticidas com este adsorvente, sendo parcialmente removidos pelo solvente (TORRES et al, 1997).

Na Figura 2.2 está representado os cromatogramas dos extratos recuperados em acetonitrila, após a extração dos quatro pesticidas em tomate fortificados, pelo método da DMFS.



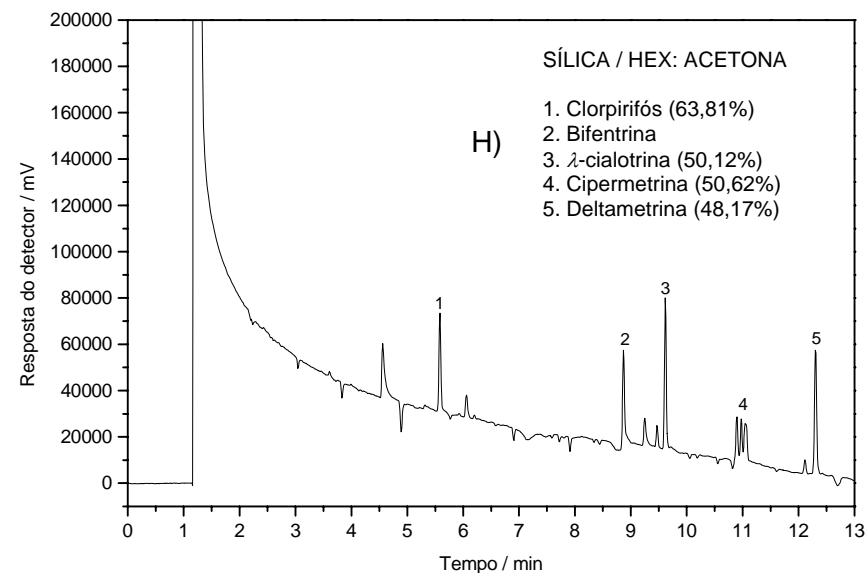
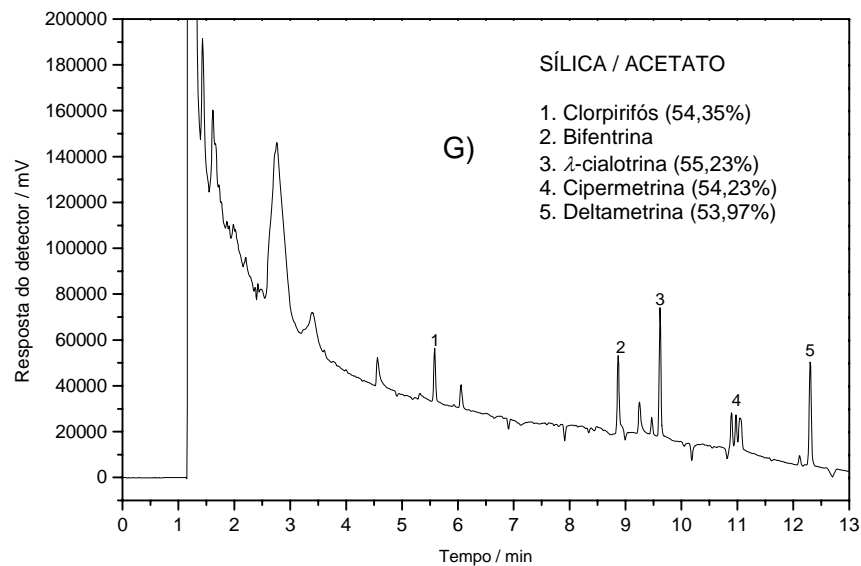
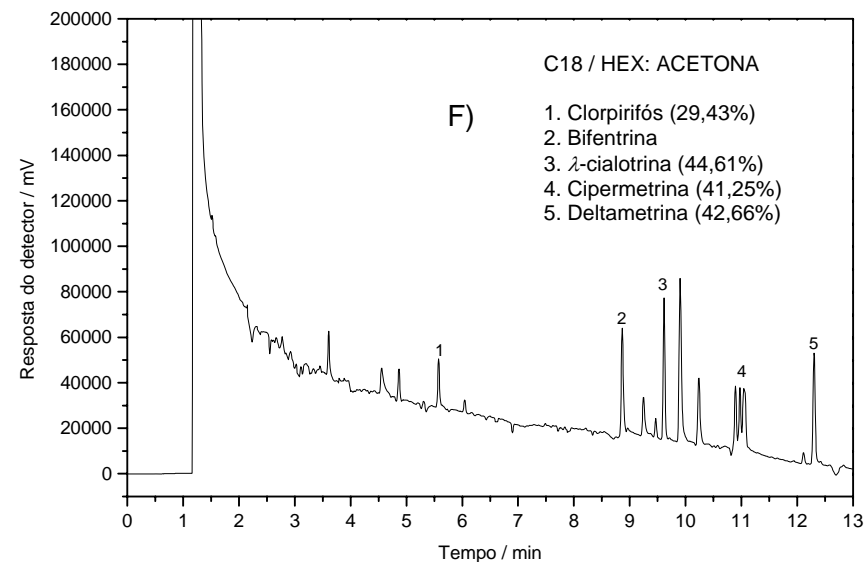
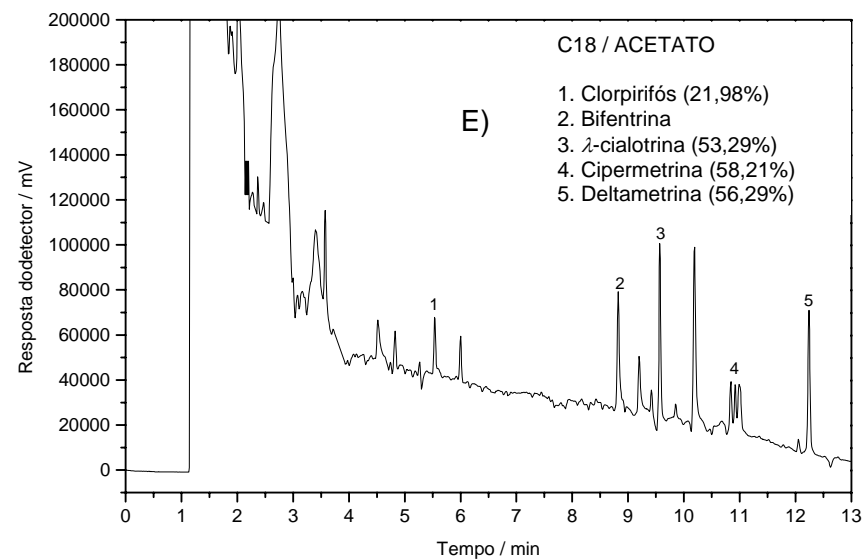


Figura 2.2 – Cromatogramas obtidos por DMFS para os pares adsorventes/eluentes: A) Florisil / Acetato, B) Forisil / Hexano:Acetona, C) C8 / Acetato e D) C8 / Hexano:Acetona, E) C18 / Acetato, F) C18 / Hexano:Acetona, G) Sílica / Acetato e H) Sílica / Hexano:Acetona.

Avaliando-se a qualidade dos cromatogramas, percebe-se que aqueles obtidos de extratos em que o hexano: acetona (9:1) foi usado como eluente, são mais puros. Os cromatogramas B, D, F e H da Figura 2.2 mostraram, aparentemente, serem extratos mais puros, especialmente na região após a resposta do solvente.

Comparando-se os resultados obtidos usando o mesmo eluente, observa-se o efeito do adsorvente na pureza dos extratos. Em todos eles, os picos dos pesticidas 1, 2, 3, 4 e 5, estão bem separados. No entanto, no cromatograma H, obtido do extrato usando hexano: acetona (9:1) como eluente e sílica como adsorvente, observa-se a ausência de todos os picos interferentes que estão presentes nos demais cromatogramas. Entretanto, quantitativamente, no extrato, o adsorvente sílica proporcionou rendimentos de extração insatisfatórios (Tabela 2.3).

Os cromatogramas dos extratos em que o florisil foi utilizado, mesmo apresentando picos de outras espécies além dos pesticidas de interesse, são de pureza satisfatória. Os extratos de um branco não mostraram a presença de nenhum interferente com tempo de retenção igual aos dos pesticidas. Comparativamente também com esse adsorvente foram obtidas as melhores taxas de recuperação.

Para o florisil, usando maiores volumes de acetato de etila, não foi possível melhorar a eficiência de extração. Uma segunda eluição feita no cartucho mostrou que o processo não era eficiente para extrair os pesticidas que ainda estavam adsorvidos (Figura 2.3). Quantitativamente a maior parte (60 a 90%) dos pesticidas encontrava-se na primeira extração ao passo que na segunda extração não excedia a 6%.

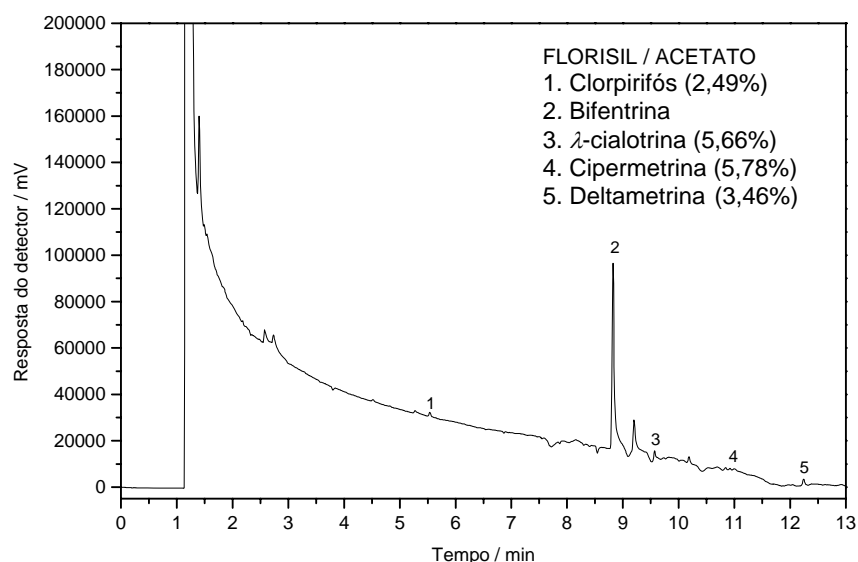


Figura 2.3 – Cromatograma de extrato obtido por DMFS para a extração dos pesticidas em tomate para uma segunda eluição com acetato de etila no mesmo cartucho.

Embora muitos trabalhos na literatura não reportem a importância do condicionamento dos adsorventes na DMFS, estes quando são condicionados antes da dispersão da amostra, podem diminuir a presença de interferentes e possibilitar melhor porcentagem de recuperação dos pesticidas (BARKER et al, 2000a).

Os cromatogramas da Figura 2.4 (A e B) mostram a influência do condicionamento do florisil utilizado como dispersante da amostra e da sílica usada como co-coluna. O condicionamento foi realizado com acetato de etila, em banho ultra-sônico por 10 minutos, antes da dispersão da amostra.

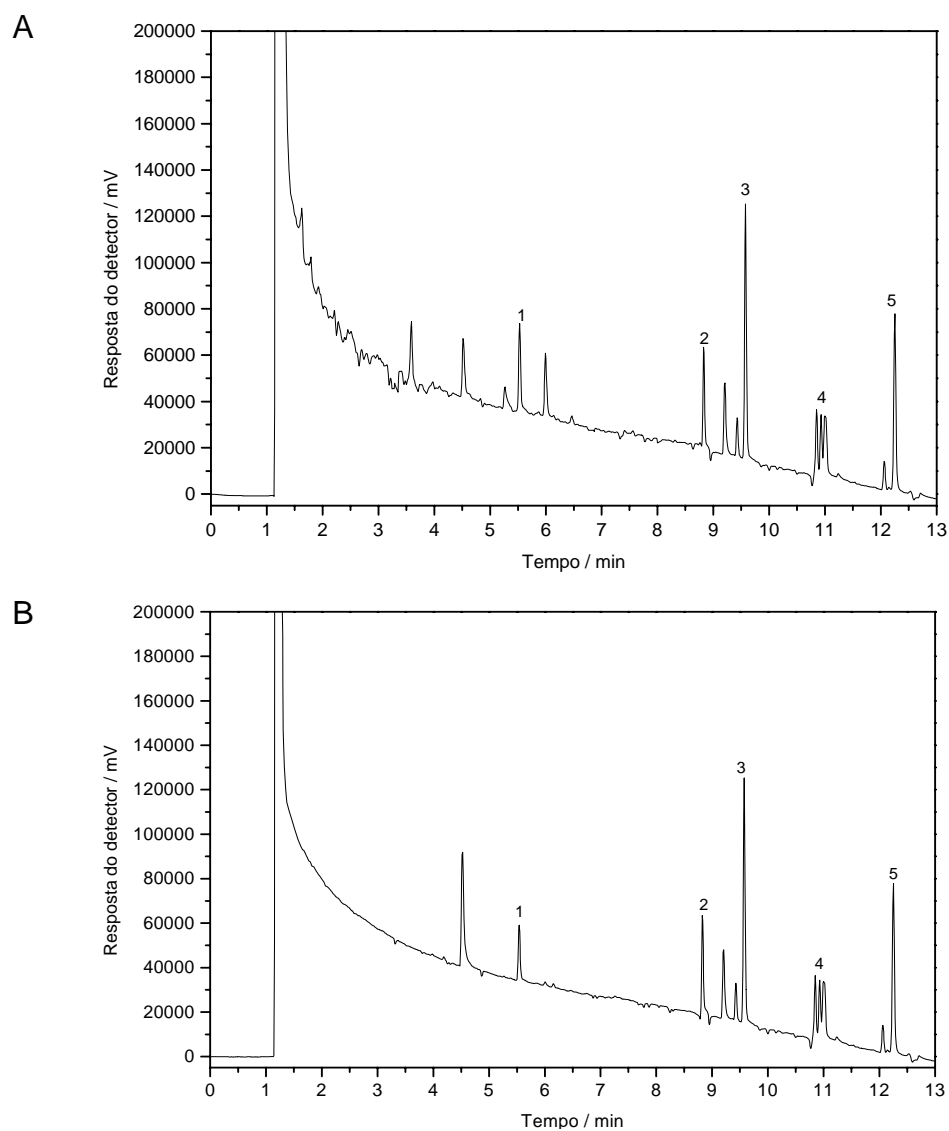


Figura 2.4 - Cromatogramas obtidos de extratos obtidos da DMFS: A) Extração dos pesticidas sem condicionamento do adsorvente, B) Extração dos pesticidas com condicionamento do adsorvente.

As porcentagens de extração dos pesticidas foram similares nas duas situações. Entretanto, o não condicionamento dos adsorventes resultou em cromatogramas com muito ruído e sinais de impurezas, como pode ser verificado na Figura 2.4A.

2.2.2. Planejamento Fatorial

O planejamento fatorial completo 2^3 foi escolhido por permitir avaliar a influência dos fatores (proporção de adsorvente/amostra, presença de co-

coluna e auxílio do banho ultra-sônico na extração), sobre a porcentagem de recuperação, e suas possíveis interações, com um número mínimo de experimentos. As condições empregadas em cada ensaio e os valores encontrados para as porcentagens de recuperação dos pesticidas são descritos na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Resultados de um planejamento fatorial 2^3 para estudar o efeito de três fatores sobre a porcentagem de extração dos pesticidas em amostras de tomate

Ensaio	Fatores originais			% Recuperação (CV)			
	Adsorvente/ Amostra (1)	Co- coluna (2)	Banho ultra-sônico (3)	Clorp.	Cialot.	Ciper.	Deltam.
1 e 2	1:1	sem	sem	52,15 (3,39)	71,32 (3,22)	84,16 (3,08)	80,24 (1,60)
3 e 4	2:1	sem	sem	39,11 (12,02)	61,21 (5,85)	84,42 (4,12)	73,70 (3,47)
5 e 6	1:1	com	sem	36,06 (12,20)	79,12 (2,90)	85,71 (0,80)	81,42 (5,44)
7 e 8	2:1	com	sem	39,60 (1,86)	73,85 (4,35)	78,91 (4,62)	69,17 (3,40)
9 e 10	1:1	sem	com	60,69 (2,38)	84,78 (0,56)	84,73 (0,48)	86,41 (2,23)
11 e 12	2:1	sem	com	64,73 (4,86)	88,28 (3,17)	99,21 (0,52)	89,18 (3,77)
13 e 14	1:1	com	com	49,57 (4,49)	89,79 (7,32)	86,87 (0,27)	89,54 (5,42)
15 e 16	2:1	com	com	62,52 (1,32)	90,15 (1,17)	94,70 (3,49)	86,70 (5,33)

As taxas de recuperação de cada um dos 16 ensaios foram tratados estatisticamente com o objetivo de avaliar a influência de cada um dos fatores isoladamente bem como das interações entre os fatores em suas taxa de recuperação.

Na Tabela 2.5 estão resumidamente as taxas médias de recuperação de cada um dos pesticidas, o efeito de cada fator, suas interações e as estimativas do erro experimental. As estimativas dos efeitos correspondem a influências significativas, ao nível de 95% de probabilidade.

Tabela 2.5 – Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (\pm estimativa do erro experimental) de extração de cada um dos pesticidas, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de tomate

	Clorpirifós	λ -cialotrina	Cipermetrina	Deltametrina
Recuperação média	50,55 \pm 1,40	79,81 \pm 1,64	87,34 \pm 1,17	82,04 \pm 1,71
(1) Adsorvente / Amostra	1,87 \pm 2,80	-2,88 \pm 3,28	3,94 \pm 2,34	-4,72 \pm 3,41
(2) Co-coluna	-7,23\pm2,80*	6,83 \pm 3,28	-1,58 \pm 2,34	-0,67 \pm 3,41
(3) Banho ultra-sônico	16,88\pm2,80*	8,08\pm3,28*	11,83\pm2,34*	0,00 \pm 3,41
(1) e (2)	6,37 \pm 2,80	0,42 \pm 3,28	-3,43 \pm 2,34	-2,83 \pm 3,41
(1) e (3)	6,62\pm2,80*	4,81 \pm 3,28	7,21\pm2,34*	4,68 \pm 3,41
(2) e (3)	0,57 \pm 2,80	-3,39 \pm 3,28	0,40 \pm 2,34	1,00 \pm 3,41
(1) e (2) e (3)	-1,92 \pm 2,80	-2,00 \pm 3,28	0,10 \pm 2,34	0,03 \pm 3,41

* Efeito estatisticamente significativo ao nível de 95% de probabilidade pelo teste t.

Verificou-se que a proporção adsorvente: amostra não influenciou significativamente ao nível de 95% de probabilidade pelo teste t na porcentagem de extração dos pesticidas pela DMFS, considerando apenas as proporções 1:1 e 2:1 de adsorvente: amostra. Todavia, proporções maiores podem ser utilizadas para melhorar o rendimento de extração, conforme sugerido por BARKER (2000b) a proporção 4:1, para análise de pesticidas em frutas, vegetais e alimentos processados usando como dispersantes fases ligadas (C-8 ou C-18). PENSADO et al (2005) avaliou a extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em peixes com C-18 na proporção 3:1 (adsorvente: amostra).

Já a presença da co-coluna apresentou um efeito significativamente negativo na extração do clorpirifós, diminuindo de 7,23% a porcentagem de recuperação. O clorpirifós por ser um pesticida mais polar adsorve mais fortemente na sílica que também é polar, dificultando a eluição.

Embora estatisticamente não se tenha observado nenhuma influência significativa na extração dos piretróides, a presença da co-coluna afeta qualitativamente os cromatogramas. Comparativamente os cromatogramas dos extratos em que foi utilizada a co-coluna (Figuras 2.5 A e B) apresentaram menos picos desconhecidos em relação aqueles em que a co-coluna não foi utilizada.

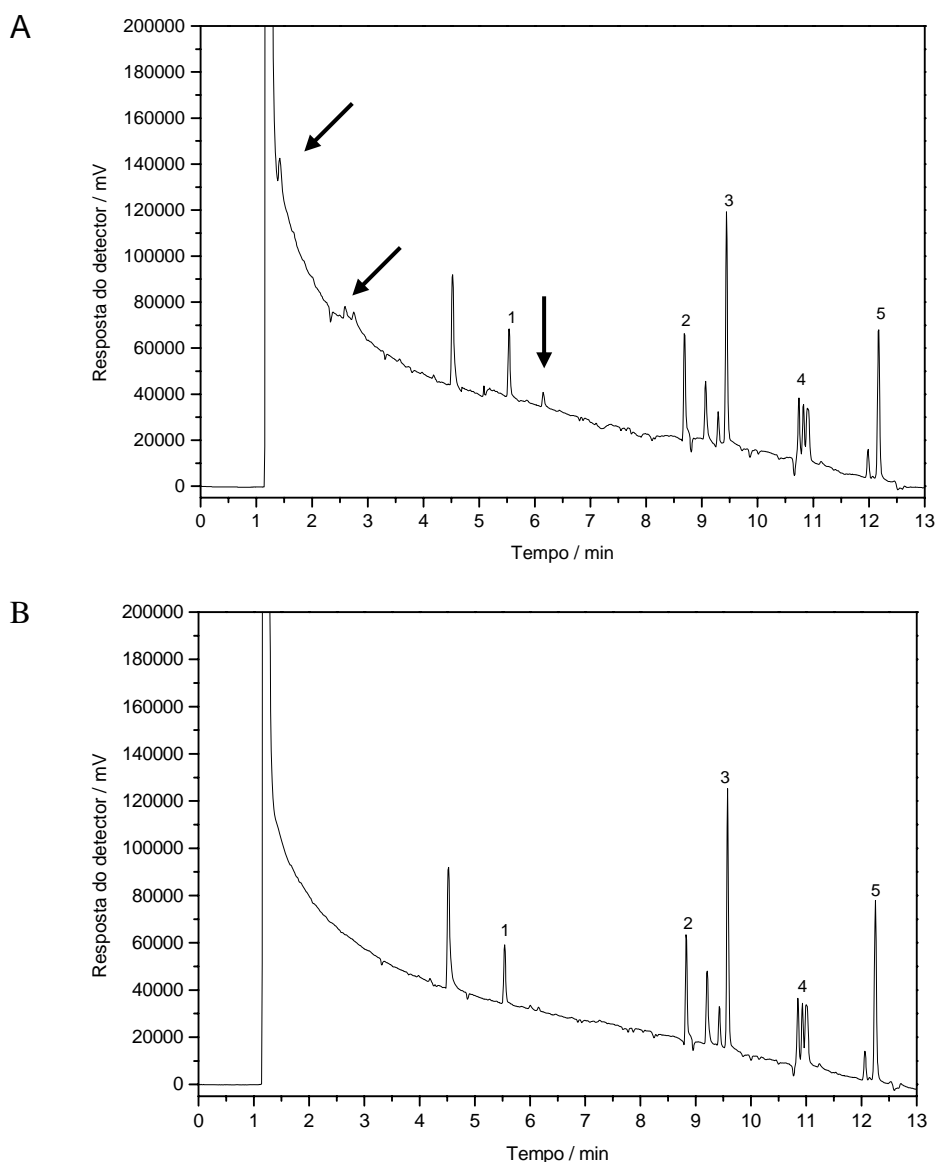


Figura 2.5 – Cromatogramas de extratos obtidos da DMFS para o par Florisil/Acetato de etila: A) Extração dos pesticidas com condicionamento prévio do florisil e sem uso da co-coluna (sílica), B) Extração dos pesticidas com florisil e com uso da co-coluna (sílica), ambos com condicionamento prévio.

As setas indicadas na Figura 2.5A mostram os componentes da matriz que foram eliminados na presença de sílica como co-coluna. Observou-se também, uma redução dos ruídos na linha de base. Portanto, para análise de piretróides em amostras de tomate a presença de sílica como co-coluna não interfere na extração destes pesticidas e melhora a qualidade dos cromatogramas eliminando componentes da matriz. Entretanto, na análise do

organofosforado (clorpirifós) não é recomendável, pois diminui a porcentagem de extração.

O banho ultra-sônico foi o fator que apresentou maior influência na recuperação dos pesticidas, como verificado na Tabela 2.5. O rendimento da extração para o clorpirifós, λ -cialotrina e cipermetrina aumentaram, respectivamente, de 16,88%; 8,08% e 8,83%. Resultados semelhantes foram observados por ALBERO et al (2003) na extração de endosulfan em polpas de tomate. A deltametrina foi o único pesticida que não sofreu interferência do ultra-som.

Observou-se que há um efeito de interação apenas entre os fatores (1) e (3), ou seja, quando a extração é realizada com o adsorvente em maior proporção (2:1) em banho ultra-sônico, a porcentagem de extração do clorpirifós e cipermetrina aumentou significativamente em 6,62% e 8,08%, respectivamente. Para os outros dois pesticidas a λ -cialotrina e deltametrina o aumento de 4,81% e 4,68%, respectivamente, não foi significativo.

Portanto, usar o florisil previamente condicionado na proporção adsorvente: amostra 2:1, não utilizar co-coluna e deixar o cartucho exposto ao banho ultra-sônico foram as melhores condições de extração dos pesticidas clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina, em amostras de tomate por DMFS.

2.2.3. Metodologia otimizada

A metodologia de extração DMFS aplicada para os pesticidas clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em amostras de tomate após a otimização foi estabelecida da seguinte maneira:

Em cápsula de porcelana é adicionado 0,5000 g de amostra de tomate, previamente fortificada com 1,00 mg kg⁻¹. Macera-se a amostra com 0,5000 g de florisil (condicionado com acetato de etila em banho ultra-sônico) até a completa dispersão da matriz, sendo transferida a mistura, em seguida, para um cartucho contendo 1,0000 g de Na₂SO₄ anidro. São adicionados 5,0 mL de acetato de etila no cartucho e levado ao banho ultra-sônico por 10 minutos. Posteriormente, é realizada a eluição com mais 5,0 mL de solvente, e coletadas em frascos de vidro. Acrescenta-se 50,0 μ L de padrão interno (bifentrina) a 10,0 mg L⁻¹. O solvente é evaporado sob corrente de ar, e o

extrato recuperado em 1,0 mL de acetonitrila e guardados no freezer até o momento da análise cromatográfica.

2.3. Comparação das técnicas de ESL-PBT e DMFS

A DMFS não é considerada oficialmente um método de referência. Entretanto, esta técnica tem sido empregada na extração de vários pesticidas em alimentos como feijão (LOPES & DOREA, 2003), laranja (CARDOSO et al, 2004), chá (HU et al, 2005), etc. A vantagem desta técnica se deve ao fato de que a extração dos analitos e o *clean up* dos extratos são realizados simultaneamente (KRISTENSON et al, 2006). Desta forma, a DMFS pode ser considerada como uma valiosa ferramenta na extração de contaminantes em matrizes complexas como produtos comestíveis (BOGIALLI & CORCIA, 2006).

Assim, os resultados obtidos por ESL-PBT foram comparados com os dados da DMFS para avaliar a exatidão do método. A Tabela 2.6 mostra as porcentagens de extração, dos pesticidas pelas duas técnicas, calculadas para amostras de tomate fortificadas com 1,25 mg kg⁻¹ para a ESL-PBT e 1,00 mg kg⁻¹ para a DMFS.

Tabela 2.6 – Taxas de recuperação dos pesticidas e seus respectivos desvios padrão empregando a técnica de ESL-PBT e DMFS

Métodos	Pesticidas			
	Clorpirifós	λ -cialotrina	cipermetrina	deltametrina
ESL-PBT	82,71 \pm 3,32	86,02 \pm 3,84	95,37 \pm 4,94	95,58 \pm 2,76
DMFS	64,73 \pm 3,15	88,28 \pm 2,80	99,21 \pm 0,52	89,18 \pm 3,77

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2.6, pode-se verificar que as técnicas de extração em estudo apresentaram porcentagens de recuperação estatisticamente iguais, ao nível de 95% de probabilidade pelo teste t, para a λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina. A ESL-PBT mostrou-se mais eficiente na recuperação do clorpirifós.

Vale destacar que a técnica DMFS é mais susceptível à presença de interferentes nos extratos em relação a ESL-PBT, provenientes dos adsorventes, componentes da matriz, solventes, etc. Embora na DMFS se utilize uma quantidade de amostra oito vezes menor que a ESL-PBT (4,0000 g

: 0,5000 g) é necessário que o extrato final na DMFS seja concentrado dez vezes (10 mL : 1 mL). Desta forma os interferentes estão mais concentrados na DMFS. Além disso, a ESL-PBT é uma técnica que exige custos menos elevados, pois se utiliza, basicamente solventes, enquanto que a DMFS exige também adsorventes, não recuperáveis ao final do experimento.

Quando se compara qualitativamente os cromatogramas, as duas técnicas, ESL e DMFS, mostraram-se equivalentes. Para isso, na dispersão da matriz em fase sólida seria necessário utilizar co-coluna para auxiliar no *clean up* e que os adsorventes sejam previamente condicionados, o que aumenta consideravelmente o consumo de solventes. Caso contrário a ESL-PBT produz cromatogramas mais limpos.

Portanto, a técnica de extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura é uma alternativa de extração dos pesticidas clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em amostras de tomate, proporcionando resultados qualitativos e quantitativos mais satisfatórios, quando comparado com a dispersão da matriz em fase sólida.

CONCLUSÕES

Nesse trabalho foram otimizadas as técnicas de DMFS e ESL-PBT, sendo esta última também validada. Essas técnicas foram utilizadas na extração dos pesticidas clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em amostras de tomate.

Durante a otimização da ESL-PBT foi realizado um planejamento de misturas, para avaliar a influência da polaridade da mistura extratora na porcentagem de extração dos pesticidas. A mistura composta por 80% de acetonitrila, 15 % de acetato de etila e 5% de água proporcionou extrações superiores a 80% dos pesticidas. Entretanto estas taxas de recuperação dos pesticidas apresentaram efeito de matriz significativo, principalmente os compostos de maiores tempo de retenção, como a deltametrina e cipermetrina. Os extratos obtidos na ESL-PBT apresentaram coloração intensa que foram significativamente removidos com 10 mg de carvão ativado, no entanto este adsorvente diminuiu expressivamente a taxa de extração dos pesticidas, principalmente o clorpirifós. Os resultados obtidos nos parâmetros de validação, como seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão indicam que os métodos ESL-PBT é eficiente para a extração dos pesticidas em amostras de tomate, possibilitando as análises cromatográficas das amostras e a determinação dos resíduos destes piretróides em tomates com limites de quantificação próximos a $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Para a DMFS foi realizado um planejamento fatorial em que foram estudados simultaneamente os efeitos da proporção entre a quantidade de adsorvente e amostra (1:1 e 2:1), presença de co-coluna e auxílio do banho ultra-sônico na extração dos pesticidas por esta técnica. A eficiência da extração foi melhor quando a proporção de adsorvente/amostra 2:1 foi utilizada com o auxílio do banho ultra-sônico para a extração. Já a presença da co-coluna de sílica auxilia no *clean up* dos extratos, porém reduz a taxa de recuperação do clorpirifós significativamente.

Portanto, quando se compara qualitativamente e quantitativamente as duas técnicas de extração, a ESL-PBT proporcionou resultados mais satisfatórios que a DMFS na extração dos pesticidas clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em amostras de tomate.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-ARAB, A. A. K. Behavior of pesticides in tomatoes during commercial and home preparation, **Food Chemistry**, **65**: 509-514, 1999.

ALBERO, B.; BRUNETE, C. S.; TADEO, J. L. Determination of endosulfan isomers and endosulfan sulfate in tomato juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. **Journal of chromatography A**, **1007**: 137-143, 2003.

ANGLIN, C.; MCKINLEY, W. P. Procedure for Cleanup of Plant Extracts Prior to Analyses for DDT and Related Pesticides, **J. Agr. Food Chem.**, **8**: 186-189, 1960.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2006.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas o homem e o meio ambiente**. Viçosa: ed. UFV, 215 p. 2004.

BARKER S. A. Matrix solid-phase dispersion, **Journal of Chromatography A**, **885**: 115-127, 2000a.

BARKER, S. A. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis, **Journal of Chromatography A**, **880**: 63-68, 2000b.

BOGIALLI, S.; CORCIA, A. Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs, **J. Biochem. Biophys. Methods**, 2006 (no prelo).

CABRAS, P.; CABITZA, F.; MELONI, M.; PIRISI, F. M. Behavior of some pesticide residues on greenhouse tomatoes. 2. Fungicides, acaricides and insecticides. **J. Agric. Food Chem.**, **33**: 935-937, 1985.

CARDOSO, M. H. W. M.; BASTOS, L. H. P.; NEVES, T. S.; ABRANTES, S. Implementação da técnica de extração de dispersão da matriz em fase sólida (“MSPD”) para determinação de resíduos de agrotóxicos em laranjas, **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, **24 (2)**: 298-302, 2004.

CARVALHO, W.; FONSECA, M. E. N.; SILVA, H. R.; BOITEUX, L. S.; GIORDANO, L. B. Estimativa indireta de teores de licopeno em frutos de genótipos de tomateiro via análise colorimétrica. **Horticultura Brasileira**, **232 (3)**: 819-825, 2005.

CELLA, A. L. **Ocorrência de agrotóxicos organofosforados e do organoclorado dicofol em maçãs**. 2002. 80f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHU, X.; HU, X.; YAO, H. Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass selective detection, **Journal of Chromatography A**, **1063**: 201–210, 2005.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: ed. UNICAMP, 453 p. 2006.

D’AMATO, C.; TORRES, J. P. M., MALM, O. DDT (diclodifeniltricloroetano): Toxicidade e contaminação ambiental – Uma revisão, **Química Nova**, **25 (6)**:, 995-1002, 2002.

EPA–Environmental Protection Agency – Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/op/primer.htm>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2006>

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

FERRER, C.; GOMEZ, M. J.; GARCIA-REYES, J. F.; FERRER, I.; THURMAN, E. M.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry **Journal of Chromatography A**, **1069**: 183–194, 2005.

FERST, J. C. **Resíduos de clorpirifós e fenitroton em casca e polpa de pepino “caipira” determinados por cromatografia em fase gasosa**. 1991. 71f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. São Paulo.

FREITAS, J. B. **Dissipação dos resíduos do inseticida metamidofós em frutos de tomateiro**. 1992. 54f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agronomia de Lavras, Lavras.

FYTIANOS, K.; RAIKOS, N.; THEODORIDIS, G.; VELINOVA, Z.; TSOUKALI, H. Solid phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in fruits, **Chemosphere**, **65**: 2090-2095, 2006.

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

GOBO, A. B. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de resíduos de pesticidas em tomate por CG-NPD**. 2001. 132f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria.

GONZALEZ, F.J. E.; TORRES, M.E. H.; LOPEZ, E. A., CUADROS-RODRIGUEZ, L.; VIDALA, J. L. M. Matrix-effects of vegetable commodities in electron-capture detection applied to pesticide multiresidue analysis, **Journal of Chromatography A**, **966**: 155-165, 2002.

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

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

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

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

HU, Y.; ZHENG, P.; HE, Y.; SHENG, G. Response surface optimization for determination of pesticide multiresidues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography, **Journal of Chromatography A**, **1098**: 188-193, 2005.

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

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

KASCHERES, C.; CUNHA, I. B. S. Piretróides como uma classe de inseticidas. Aplicações, desenvolvimento químico e perspectivas, **Química Nova**, **12 (8)**: 272-281, 1989.

KOCOUREK, V.; HAJSLOVA, J.; HOLADOVÁ, K.; POUSTKA, J. Stability of pesticides in plant extracts used as calibrants in the gas chromatographic analysis of residues, **Journal of Chromatography A**, **800**: 297-304, 1998.

KRISTENSON, E. M., RAMOS, L.; BRINKMAN, U.A.TH. Recent advances in matrix solid-phase dispersion, **Trends in Analytical Chemistry**, **25 (2)**: 96-111, 2006.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: ed. Rima, 96 p. 2004.

LARA, W. H., BATISTA, G. C. Pesticidas, **Química Nova**, **15 (2)**:161-166, 1992.

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

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

LIDE, DAVID R. **CRC Handbook of Chemistry and physics**, 75 th edition, London, 1995.

LING, Y. C.; HUANG, I. P. Multi-residue matrix solid-phase dispersion method for the determination of six synthetic pyrethroids in vegetables followed by gas chromatography with electron capture detection. **Journal of chromatography A**, **695**: 75-82, 1995.

LOPES, W. G.; DÓREA, H. S. Determinação de pesticidas em feijão por dispersão da matriz em fase sólida (DMFS), **Pesticidas: R. ecotoxicol. e meio ambiente**, **13**: 73-82, 2003.

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

MENKISSOGLU-SPIROUDI U.; FOTOPOULOU, A. Matrix effect in gas chromatographic determination of insecticides and fungicides in vegetables **Intern. J. Environ. Anal. Chem.**, **84**: 15–27, 2004.

National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals. **The NRA review of chlorpyrifos**; Volume 1, Canberra: NRA, 2000, 98 p.

NAVARRO, M.; PICÓ, Y.; MARÍN, R.; MAÑES, J. Application of solid-phase dispersion to the determination of a new generation of fungicide in fruits and vegetables, **Journal of Chromatography A**, **968**: 201–209, 2002.

PAPADAKIS, E. N.; VRYZAS, Z.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Rapid method for the determination of 16 organochlorine pesticides in sesame seeds by microwave-assisted extraction and analysis of extracts by gas chromatography–mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, **1127**: 6–11, 2006.

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

PENSADO, L.; CASAIS, M. C.; MEJUTO, M. C.; CELA, R. Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples, **Journal of Chromatography A**, **1077**: 103–109, 2005.

PENTEADO, S. R. **Cultivo orgânico de tomate**. Viçosa: Ed. Aprenda Fácil, 210 p. 2004.

POOLE, C. F. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography, **Journal of Chromatography A**, 2007 (no prelo).

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

RIBEIRO, M. L.; LOURENCETTI, C.; PEREIRA, S. Y.; MARCHI, M. R. R. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar, **Química Nova**, 2007. (no prelo)

RUSSO, M. V.; CAMPANELLA, L.; AVINO, P. Determination of organophosphorus pesticide residues in human tissues by capillary gas chromatography–negative chemical ionization mass spectrometry analysis, **Journal of Chromatography B**, **780**: 431- 441, 2002.

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

SANTOS, S. A, Química dos inseticidas (parte I), **Química**, **85**: 43-47, 2002.

SARAIVA. M.A. R. **Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. Lavras: ed. UFLA, 400 p. 2004.

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

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

SILVA, H. J.; SAMARAWICKREMA, N. A.; WICKREMASINGHE, A. R. Toxicity due to organophosphorus compounds: what about chronic exposure? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **100**: 803-806, 2006.

SIMONETTI, P; GARDANA, C.; RISO, P.; MAURI, P.; PIETTA, P.; PORRINI, M. Glycosylated flavonoids from tomato puree are bioavailable in humans, **Nutrition Research**, **25**: 717–726, 2005.

SODERLUND, D. M.; CLARK, J. M.; SHEETS, L. P.; MULLIN, L. S.; PICCIRILLO, V. J.; SARGENT, D.; STEVENS, J. T.; WEINER, M. L. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, **171**: 3-59, 2002.

SOJO, L., BROCKE, E.; A.; FILLION, J.; PRICE, S., M. Application of activated carbon membranes for on-line cleanup of vegetable and fruit extracts in the determination of pesticide multiresidues by gas chromatography with mass selective detection, **Journal of Chromatography A**, **788**: 141-154, 1997.

TORRES, C.M.; PICÓ, Y.; MAÑES, J. Comparison of octadecylsilica and graphitized carbon black as materials for solid-phase extraction of fungicide and insecticide residues from fruit and vegetables, **Journal of Chromatography A**, **778**: 127-137, 1997.

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

VIEIRA, H. P. **Otimização e validação da extração simultânea de piretróides em água e solo e análise por cromatografia gasosa**. 2005. 65f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, 2007. (no prelo)

WESSELING, C.; CORRIOLS, M.; BRAVO, V. Acute pesticide poisoning and pesticide registration in Central America, **Toxicology and Applied Pharmacology**, **207**: 697-705, 2005.

ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M. Analysis of Pesticide Residues in Brazilian Medicinal Plants: Matrix Solid Phase Dispersion *versus* Conventional (European Pharmacopoeia) Methods, **J. Braz. Chem. Soc.**, **14** (2): 304-309, 2003.