

ÉRICA PACHECO SILVA

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO E
ANÁLISE MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS
EM CARNE BOVINA POR CROMATOGRÁFIA
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
2008

ÉRICA PACHECO SILVA

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO E
ANÁLISE MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS
EM CARNE BOVINA POR CROMATOGRÁFIA
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: 13 de outubro de 2008

Prof. Dr. Antônio Augusto Neves
(Co-orientador)

Prof. Dr. José Humberto de Queiroz
(Co-orientador)

Prof. Dr. Robson José de C. F. Afonso

Prof^ª. Dra. Regina Célia S. Mendonça

Prof^ª. Dra. Maria Eliana L. R. de Queiroz
(Orientadora)

*À Deus,
Aos meus pais Geraldo e Ana,
À minha irmã Leidiane,
Ao Rodrigo,*

*“Que bom que o seu amor me escolheu, que bom que o seu sorriso deu a
força, me deu coragem...”*

Com amor dedico

AGRADECIMENTOS

Aos professores, Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e Antônio Augusto Neves, pela oportunidade, apoio, ensinamentos transmitidos, pela força e orientação.

Ao professor Cláudio Lima, pela idéia e professor José Humberto pela co-orientação.

Aos professores Robson Afonso e Regina Mendonça pela participação na banca.

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

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

A todos os amigos do laboratório de química analítica – LAQUA: Aline, Ana Beatriz, Ana Cláudia, Armanda, Deyse, Elenice, Elisa, Flaviane, Igor, Kamilla, Leila, Maria Antônia, Ricardo Martins e Simone pelo auxílio, amizade e agradável convívio. A Gevany pelos conselhos preciosos e pela atenção. Ao Ricardo, pela ajuda na execução do trabalho e pela paciência.

À Shisley por toda força, apoio, incentivo, cuidado, convivência, aprendizado de vida, momentos alegres e pela amizade. Bruna e Cláudia, morar com vocês foi maravilhoso, obrigado a todas vocês por viverem comigo cada momento dessa dissertação. Emanuel pela amizade e convivência no laboratório sempre tão agradável, divertida e confidente. Leandro, Kamilla, Cássia, Carol, Marina, Thaís, pela amizade preciosa. Levo vocês no meu coração pra sempre.

À Marisa pela ajuda com todas as documentações e dúvidas administrativas, aos vigias da segurança da Vila Gianetti - UFV e do condomínio Mundial Azul, pela segurança e a todos os amigos que de todas as formas contribuíram para a realização desse trabalho.

BIOGRAFIA

ÉRICA PACHECO SILVA, filha de Geraldo da Silva e Ana de Fátima Pacheco Silva, nasceu em São Paulo, São Paulo, em 05 de Novembro de 1983.

Em março de 2002, iniciou o Curso de Graduação em Química, pela Universidade Federal de Ouro Preto, diplomando-se como bacharel em julho de 2006.

Em outubro de 2006, iniciou o curso de pós-graduação em Agroquímica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em outubro de 2008.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. AGROTÓXICOS	1
1.2. RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS.....	3
1.3. O USO DE CARRAPATICIDAS EM REBANHOS BOVINOS	4
1.4. PIRETRÓIDES	6
1.5. ORGANOCLORADOS	7
1.6. ORGANOFOSFORADOS.....	9
1.7. CARNE BOVINA.....	10
1.8. METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS.....	11
1.8.1. Extração Sólido-Líquido com Purificação em Baixa Temperatura.....	13
1.8.2. Dispersão de Matriz em Fase Sólida	14
1.9. CROMATOGRAFIA.....	15
1.10. EFEITO DE MATRIZ	15
1.11. VALIDAÇÃO	20
1.12. OBJETIVOS	22
1.12.1. Objetivos Gerais:.....	22
1.12.2. Objetivos específicos:	22
2. MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.1. PREPARO DE SOLUÇÕES PADRÃO.....	24
2.2. AMOSTRAS DE CARNE	24
2.3. EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA – ESL-PBT.....	25
2.3.1. Fortificação das amostras de carne.....	25
2.3.2. Extração dos agrotóxicos em carne bovina por ESL-PBT – Técnica geral.....	25
2.3.3. Otimização da técnica extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT).....	26
2.3.3.1. Ensaio preliminares.....	27
2.3.4. Planejamento fatorial 2 ³	27
2.3.5. Efeito do ultra-som na eficiência de extração dos analitos em carne bovina	29
2.3.6. Eficiência de adsorventes no <i>clean up</i> dos extratos obtidos na ESL-PBT de amostras de carne bovina	30
2.4. DISPERSÃO DE MATRIZ EM FASE SÓLIDA – DMFS.....	31
2.4.1. Fortificação das amostras de carne.....	31
2.4.2. Extração dos agrotóxicos em carne bovina por DMFS – Técnica Geral.....	31
2.4.3. Avaliação do adsorvente e eluente para a técnica de extração DMFS	32
2.5. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	33
2.6. Análise quantitativa dos agrotóxicos em carne bovina.....	34
2.7. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	34
2.7.1. Seletividade.....	35
2.7.2. Linearidade de resposta do método proposto	35
2.7.3. Limite de detecção e limite de quantificação do CG-DCE.....	35
2.7.4. Precisão	36

2.7.4.1.	Repetitividade.....	36
2.7.4.2.	Precisão intermediária	36
2.7.5.	Exatidão.....	36
2.7.5.1.	Ensaio de recuperação	37
2.8.	AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ NA PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DOS AGROTÓXICOS	37
2.8.1.	Superposição de matriz	37
2.8.2.	Variação da resposta do detector em função da saturação do sistema de injeção	38
2.9.	APLICAÇÃO DA TÉCNICA ESL-PBT EM AMOSTRAS DO COMÉRCIO DE VIÇOSA-MG	38
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1.	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	40
3.2.	CURVAS ANALÍTICAS E LINEARIDADE DA RESPOSTA DO DETECTOR	42
3.3.	OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA (ESL-PBT).	44
3.3.1.	Avaliação da massa de carne bovina.....	44
3.3.2.	Tempo de contato entre os agrotóxicos e as amostras de carne bovina.....	46
3.4.	PLANEJAMENTO FATORIAL NA OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ESL-PBT	47
3.5.	EFEITO DA AGITAÇÃO MECÂNICA E SONICAÇÃO NA EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO DOS AGROTÓXICOS EM CARNE BOVINA	56
3.6.	EFICIÊNCIA DE ADSORVENTES NO <i>CLEAN UP</i> DOS EXTRATOS OBTIDOS NA ESL-PBT DE AMOSTRAS DE CARNE BOVINA.....	58
3.7.	MÉTODO OTIMIZADO DA ESL-PBT E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA DE QUATRO AGROTÓXICOS EM CARNE BOVINA.....	62
3.8.	DISPERSÃO DE MATRIZ EM FASE SÓLIDA – DMFS.....	62
3.8.1.	Avaliação do adsorvente e eluente para a técnica de extração DMFS	62
3.9.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	66
3.9.1.	Seletividade.....	66
3.9.2.	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	69
3.9.3.	Linearidade da metodologia otimizada	70
3.9.4.	Precisão	72
3.9.4.1.	Repetitividade.....	72
3.9.4.2.	Precisão intermediária	73
3.9.5.	Exatidão.....	74
3.10.	EFEITO DE MATRIZ NO MÉTODO MULTIRRESÍDUO	75
3.11.	DETERMINAÇÃO DOS AGROTÓXICOS CLORPIRIFÓS, ENDOSULFAN, CIPERMETRINA E DELTAMETRINA EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE ALCATRA E FÍGADO BOVINO	88
4.	CONCLUSÕES.....	89
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

LISTA DE ABREVIATURAS

ESL-PBT	Extração Sólido-Líquido com purificação em baixa temperatura
DMFS	Dispersão de Matriz em Fase Sólida
LMR	Limite Máximo de Resíduo
GARP	Grupo de Análise de Resíduo de Pesticida
AGARP	Associação Grupo de Análise de Resíduo de Pesticida
PARA	Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico
PNCR	Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carne
CCPR	Comitê do <i>Codex Alimentarius</i> sobre resíduos de pesticidas
JMPR	Joint Meeting on Pesticides Residues
CG	Cromatografia Gasosa
CL	Cromatografia Líquida
EM	Espectrômetro de Massa
DCE	Detector por Captura de Elétrons
ELL	Extração Líquido-Líquido
EFS	Extração em Fase Sólida
ESL	Extração Sólido-Líquido
CPG	Cromatografia por Permeação em Gel
DFC	Detector fotoelétrico de chama
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
CV	Coefficiente de Variação
C-18	Octadecil

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** - Estrutura da (S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl(1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate (Deltametrina)
- Figura 1.2.** - Estrutura da (RS)- α -cyano-3-phenoxybenzyl(1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate (Cipermetrina)
- Figura 1.3.** - Estruturas moleculares do 1,4,5,6,7,7-hexachloro-8,9,10-trinorborn-5-en-2,3-ylenebismethylene)sulfite - α -Endosulfan (A), β -Endosulfan (B) e Sulfato de Endosulfan (C)
- Figura 1.4.** - Estrutura do O-3,5,6-tricloro-O,O-dietil-2-piridilfosforotioato - Clorpirifós
- Figura 1.5.** – Injetor de cromatógrafo a gás.
- Figura 1.6** - Possíveis adsorções que ocorrem na superfície do vidro e lã de vidro do *liner* em uma injeção com divisão do fluxo (split). A) Agrotóxicos preparados em solvente puro. B) Agrotóxicos preparados em extratos da matriz (branco) (PINHO et al, 2008).
- Figura 2.1.** – Representação da eluição de cartuchos de polietileno contendo amostras dispersas em uma fase sólida.
- Figura 3.1.** – Cromatograma de uma solução padrão de 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos princípios ativos em acetonitrila, onde $t_R= 2,6$: clorpirifós, $t_R= 3,3$: α -endosulfan, $t_R= 3,8$: β -endosulfan, $t_R= 5,0$: bifentrina (PI), $t_R= 7,3$: cipermetrina, $t_R= 8,8$: deltametrina.
- Figura 3.2.** – Curvas analíticas dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina utilizando como padrão interno (PI) a bifentrina.
- Figura 3.3.** - Influência da massa na porcentagem de recuperação de quatro agrotóxicos de amostras de alcatra (a) e fígado (b)

Figura 3.4 - Gráfico de Pareto - amostras de alcatra

Figura 3.5 - Gráfico de Pareto - amostras de fígado

Figura 3.6. - Efeito da agitação mecânica e diferentes tempos de agitação por ultra-som na porcentagem de recuperação do clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina para amostras de alcatra.

Figura 3.7. - Efeito da agitação mecânica e diferentes tempos de agitação por ultra-som na porcentagem de recuperação do clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina para amostras de fígado.

Figura 3.8. - Influência dos adsorventes, sílica e florisil, na porcentagem de recuperação do clorpirifós, endosulfan, deltametrina e cipermetrina de extratos de fígado.

Figura 3.9. - Influência de diferentes quantidades de carvão ativado, na porcentagem de recuperação do clorpirifós, endosulfan, deltametrina e cipermetrina em amostras de fígado.

Figura 3.10. - Espectros de absorção dos extratos no UV-visível ($\lambda = 250$ a 780 nm), obtidos a partir de diferentes técnicas de extração e seus adsorventes para extratos de fígado.

Figura 3.11. - Influência de diferentes solventes na porcentagem de recuperação do clorpirifós, endosulfan, deltametrina e cipermetrina para a DMFS utilizando florisil em amostras de alcatra.

Figura 3.12. - Influência de diferentes solventes na porcentagem de recuperação do clorpirifós, endosulfan, deltametrina e cipermetrina para a DMFS utilizando sílica.

Figura 3.13. - Influência de diferentes adsorventes e eluentes na porcentagem de recuperação do clorpirifós, endosulfan, deltametrina e cipermetrina para a DMFS e comparação com a ESL-PBT.

Figura 3.14. - (A) Cromatograma do extrato obtido da matriz de alcatra isenta dos princípios ativos estudados e (B) cromatograma da amostra fortificada com $50,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ dos princípios ativos estudados, onde: $t_R = 2,6$: clorpirifós, $t_R = 3,2$: α -endosulfan, $t_R = 3,3$: β -endosulfan, $t_R = 5,0$: bifentrina (PI), $t_R = 7,3$: cipermetrina, $t_R = 8,8$: deltametrina

Figura 3.15. - (A) Cromatograma do extrato obtido da matriz de fígado isenta dos princípios ativos estudados e (B) cromatograma da amostra

fortificada com $50,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ dos princípios ativos estudados, onde: $t_R = 2,6$: clorpirifós, $t_R = 3,2$: α -endosulfan, $t_R = 3,3$: β -endosulfan, $t_R = 5,0$: bifentrina (PI), $t_R = 7,3$: cipermetrina, $t_R = 8,8$: deltametrina

Figura 3.16. - Curvas analíticas dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina obtidos da aplicação da técnica ESL-PBT em amostras de alcatra.

Figura 3.17. - Curvas analíticas dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina obtidos da aplicação da técnica ESL-PBT em amostras de fígado.

Figura 3.18 – Curvas analíticas dos princípios ativos (a) clorpirifós, (b) endosulfan, (c) cipermetrina e (d) deltametrina em acetonitrila e em extratos de alcatra bovina.

Figura 3.19 – Curvas analíticas dos princípios ativos (a) clorpirifós, (b) endosulfan, (c) cipermetrina e (d) deltametrina em acetonitrila e em extrato de fígado bovino.

Figura 3.20 – Variação relativa das respostas (Área do analito/Área do padrão interno) calculadas para os princípios ativos (a) clorpirifós, (b) endosulfan, (c) cipermetrina e (d) deltametrina quando utilizada a curva analítica em solvente (100%) e no extrato de alcatra.

Figura 3.21 – Variação relativa das respostas (Área do analito/Área do padrão interno) calculadas para os princípios ativos (a) clorpirifós, (b) endosulfan, (c) cipermetrina e (d) deltametrina quando utilizada a curva analítica em solvente (100%) e no extrato de fígado.

Figura 3.22 – Variação relativa das respostas (Área do analito) calculadas para os princípios ativos (a) clorpirifós, (b) endosulfan, (c) cipermetrina e (d) deltametrina quando utilizada a curva analítica em solvente (100%) e em extratos de alcatra.

Figura 3.23 – Variação relativa das respostas (Área do analito) calculadas para os princípios ativos (a) clorpirifós, (b) endosulfan, (c) cipermetrina e (d) deltametrina quando utilizada a curva analítica em solvente (100%) e em extratos de fígado.

Figura 3.24.a – Avaliação da taxa de aumento da resposta do detector para os agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina, deltametrina e para o padrão interno, bifentrina, em acetonitrila após saturação do sistema cromatográfico com componentes da matriz de alcatra.

Figura 3.24b – Avaliação da taxa de aumento da resposta do detector para os agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina, deltametrina e para o padrão interno, bifentrina, em acetonitrila após saturação do sistema cromatográfico com componentes da matriz de fígado.

Figura 3.25.a – Avaliação do aumento da resposta do detector para os agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina em acetonitrila após saturar o sistema cromatográfico, utilizando a razão área do padrão pela área do padrão interno para obter a porcentagem utilizando extratos de alcatra.

Figura 3.25.b – Avaliação do aumento da resposta do detector para os agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina em acetonitrila após saturar o sistema cromatográfico, utilizando a razão área do padrão pela área do padrão interno para obter a porcentagem utilizando extratos de fígado.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.1.** - Propriedades Físico-químicas dos piretróides deltametrina e cipermetrina e os LMR em Carne bovina e fígado
- Tabela 2.1.** - Planejamento fatorial 2^3 para as amostras de carne bovina fortificadas.
- Tabela 2.2.** - Adsorventes e eluentes avaliados na otimização da DMFS
- Tabela 3.1.** - Parâmetros das curvas analíticas obtidas para os quatro agrotóxicos estudados.
- Tabela 3.2.** - Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (\pm estimativa do erro experimental) na extração de cada um dos agrotóxicos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de alcatra bovina.
- Tabela 3.3.** - Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (\pm estimativa do erro experimental) na extração de cada um dos agrotóxicos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de fígado bovino.
- Tabela 3.4.** - Equações das retas e coeficientes de correlação obtidos para os agrotóxicos.
- Tabela 3.5.** - Porcentagens de recuperação (% R), desvio padrão (DP) e coeficientes de variação (CV) obtidos após sete extrações de agrotóxicos em amostras de alcatra e fígado.
- Tabela 3.6.** - Porcentagens de extração e coeficientes de variação (CV) obtidos após análise em diferentes dias, pelo mesmo analista.
- Tabela 3.7.** - Avaliação da exatidão do método de ESL-PBT, para os ensaios de recuperação e coeficiente de variação.

RESUMO

SILVA, Érica Pacheco, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Outubro de 2008. **Validação de método de extração e análise multirresíduo de agrotóxicos em carne bovina por cromatografia gasosa.** Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-orientadores: Antônio Augusto Neves e José Humberto de Queiroz.

O objetivo deste trabalho foi otimizar e validar a técnica extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) para análise de resíduos dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina em amostras de carne bovina. Na etapa de otimização, as condições ideais para extração dos agrotóxicos de interesse de amostras de alcatra e fígado bovino fortificados, foram determinadas empregando planejamento experimental. Foram avaliados a massa de amostra, solvente extrator, força iônica, tempo de extração e de fortificação e forma de agitação. As amostras de alcatra e fígado bovino e a mistura extratora em fase única foram agitadas e deixadas em freezer por aproximadamente 12 horas. A matriz e a fase aquosa congeladas foram separadas da fase superior ainda líquida. A fase superior foi filtrada e submetida à análise cromatográfica utilizando bifentrina como padrão interno. A técnica otimizada consiste em acrescentar a 3,0000 g de carne bovina, 1,0 mL de água, 6,5 mL de acetonitrila, 1,5 mL de acetato de etila, para amostras de alcatra e 1,0 mL de água e 8,0 mL de acetonitrila para amostras de fígado bovino e submeter essa mistura a agitação por ultra-som durante 10 minutos seguida de congelamento. Após separação das fases pelo congelamento da fase aquosa o sobrenadante líquido (10 mL) foi removido e analisado por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons. Avaliou-se a etapa de *clean up* para os extratos de fígado bovino, porém, esta etapa, além de aumentar o tempo e o custo da análise, reduziu a porcentagem de recuperação dos analitos. Com o intuito de comparar a ESL-PBT com outras

técnicas, submeteram-se as amostras de alcatra e fígado bovino à extração por dispersão de matriz em fase sólida (DMFS). Porém esta metodologia apresentou recuperações inferiores às obtidas pela ESL-PBT em amostras de alcatra. Para amostras de fígado, a técnica DMFS se mostrou pouco seletiva, apresentando extratos mais impuros do que os obtidos pela ESL-PBT, devido à maior extração de componentes da matriz. O método otimizado foi validado determinando-se a seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação do método, precisão e exatidão. Os resultados mostraram que a ESL-PBT otimizada é eficiente para análise de resíduos dos agrotóxicos de interesse em alcatra e fígado bovino com porcentagens de recuperação superior a 70 % e limites de detecção abaixo dos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* para estes pesticidas neste tipo de alimento. Além disso, a metodologia apresenta um pequeno consumo de solvente e ausência de etapas de purificação dos extratos antes da análise cromatográfica. O efeito de matriz mostrou-se presente na quantificação dos pesticidas por cromatografia gasosa. Para contornar esse efeito curvas de calibração foram preparadas em extratos orgânicos, obtidos da extração de alcatra e fígado bovino isento dos contaminantes. A técnica otimizada e validada foi aplicada em amostras de carne bovina adquiridas no comércio da cidade de Viçosa-MG, não sendo detectada a presença de resíduos de clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina nas amostras de alcatra e fígado analisadas.

ABSTRACT

SILVA, Érica Pacheco, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2008.

Validation of method for extraction and pesticide multiresidue analysis in beef by gas chromatography. Advisor: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-advisors: Antônio Augusto Neves and José Humberto de Queiroz.

The objective of this study was to optimize and validate the liquid-solid extraction with low-temperature purification (LSE-LTP) method for the analysis of chlorpyrifos, endosulfan, cypermethrin and deltamethrin pesticides residues in beef samples. Ideal conditions for the extraction of the pesticides of interest from the rump and liver cattle samples were determined by the employment of experimental planning to optimize the process. Sample mass, solvent extractor, ionic force, extraction time and agitation form were all evaluated. Rump and liver cattle samples were agitated with one-phase solvent mixtures and placed in a freezer for approximately 12 hours. The solids matrix and frozen aqueous phase were separated from the superior liquid phase. This superior phase was filtered and submitted to chromatography analysis using bifenthrin as an internal standard. The optimal technique consisted of supplementing 3.0000 g of beef with 1.0 mL of water, 6.5 mL of acetonitrile, 1.5 mL of ethyl acetate for the rump samples or 1.0 mL of water and 8.0 mL of acetonitrile for the liver samples, and submitting this mixture to ultrasound agitation for 10 minutes, followed by freezing. After separating the phases by freezing the aqueous phase, the supernatant liquid (10 mL) was removed and analyzed by gas chromatography with an electron capture detector. The *clean up* stage was evaluated for the liver extracts, however, during this stage, not only was the analysis time and cost increased, the percentage of analyte recovery diminished. With the intention of comparing the LSE-LTP with other techniques, the rump and liver samples were submitted to matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction.

However, this methodology presented recoveries inferior to those of the LSE-LTP in rump samples. For the liver samples, the MSPD technique showed to be little selective, presenting extracts less pure than those obtained by LSE-LTP, due to the greater extraction of matrix components. The optimized method was validated according to selectivity, linearity, detection limits and quantification of the method, precision and accuracy. The results showed that optimized LSE-LTP is efficient for the analysis of the pesticide residues of interest in rump and liver cattle with recovery percentages greater than 70 % and detection limits below the maximum residue limits (MRL) established by *Codex Alimentarius* for these pesticides in the studied beef samples. This methodology also presents the small consumption of solvent and absence of purification steps of extracts before chromatography analysis. The effect of the matrix was found to be present in the quantification of pesticides by gas chromatography. To overcome these effects, calibration curves were prepared from organic extracts, obtained from rump and liver cattle free of contaminants. The optimized and validated technique was applied in beef samples acquired commercially in the city of Viçosa, Minas Gerais, Brazil. No trace of chlorpyrifos, endosulfan, cypermethrin or deltamethrin residues were found in either rump or liver samples.

1. INTRODUÇÃO

1.1. AGROTÓXICOS

Um grande número de substâncias tem sido utilizado para eliminar formas de vida vegetal ou animal, consideradas indesejáveis nas culturas agrícolas, na pecuária, na saúde pública e no combate de vetores de doenças transmissíveis (LARA & BATISTA, 1992). Essas substâncias são conhecidas como agrotóxicos.

No Brasil, a Lei nº. 7.802/1989, regulamentada por meio de decreto 4.074, de 4 de janeiro de 2002, no artigo 2º, inciso I, define agrotóxico como produtos e componentes de processos físicos, químicos e biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas, ambientes urbanos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Inclui também substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento. Essa definição exclui fertilizantes e químicos administrados a animais para estimular crescimento ou modificar comportamento reprodutivo (BRASIL, 1989).

Quanto às pragas que controlam, os agrotóxicos são classificados em inseticidas, fungicidas, herbicidas, desfolhantes, fumigantes, rodenticidas, raticidas, moluscocidas, nematicidas e acaricidas.

A utilização de agrotóxicos pode causar problemas de ordem ecológica e de saúde pública, tais como desequilíbrios no ecossistema, resistência de insetos e de microrganismos aos princípios ativos, ocorrência de resíduos tóxicos nos alimentos, como resultado da contaminação ambiental, além da

persistência no meio ambiente e contaminação da água e do solo de onde podem ser transferidos para várias formas de vida (LARA & BATISTA, 1992).

Como os agrotóxicos são os mais eficazes no controle de pragas, o monitoramento de resíduos, decorrente de seu emprego, no meio ambiente é de fundamental importância 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 agrotóxicos em carne bovina, devido às exigências nas exportações. Em 1980, foi criado o Grupo de Análise de Resíduos de Pesticidas (GARP), que se fortaleceu transformando-se em Associação Grupo de Análise de Resíduos de Pesticidas (AGARP) com competência para resolver problemas de aquisição de padrão analítico puro, exigir maior qualidade dos solventes para análise, padronização de metodologia analítica, etc. (LARA & BATISTA, 1992).

Em 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA), implantou o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) com objetivo de monitorar os principais agrotóxicos encontrados em frutas, verduras, hortaliças e outros alimentos.

No entanto, somente em 30 de março de 2007, pela instrução normativa nº 9 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento foi aprovado o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carne (bovina, aves, suína e eqüina), leite, mel, ovos e pescado (PNCR), estabelecendo os Limites Máximos de Resíduos para agrotóxicos, organoclorados, Bifenilas Policloradas, antiparasitários, anabolizantes, etc., para as diversas matrizes, permitindo assim uma melhor avaliação da qualidade dos alimentos consumidos em relação à presença desses compostos (BRASIL, 2007).

1.2. RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

Resíduos de agrotóxicos é o termo utilizado para descrever quantidades muito pequenas de substâncias, incluindo os seus derivados, produtos de degradação e conversão, que são encontradas em diversas matrizes (MOREIRA, 1995).

O Limite Máximo de Resíduo (LMR) é definido, pelo *Codex Alimentarius*, como sendo a concentração máxima do resíduo de um agrotóxico (expresso em mg kg^{-1}), recomendado pelo Comitê do *Codex Alimentarius sobre resíduos de pesticidas* (CCPR) como sendo legalmente permitido no alimento ou ração animal. Os valores dos LMR são baseados nos dados obtidos a partir de boas práticas agrícolas e de alimentos derivados de culturas onde se respeitou o respectivo valor de LMR, pretendendo-se assim, que sejam toxicologicamente aceitáveis.

A princípio os valores dos LMR estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* são aplicados ao comércio internacional e são provenientes de estimativas feitas pela *Joint Meeting on Pesticides Residues* (JMPR) considerando a determinação toxicológica dos agrotóxicos e de seus resíduos, e considerando também as revisões dos dados de resíduos obtidos de testes e usos supervisionados (FAOSTAT, 2008).

No Brasil, estabelecer limites máximos de resíduos (LMR's) é competência do Ministério da Saúde. No caso de não estarem estabelecidos pela ANVISA, utilizam-se os definidos pelo MERCOSUL, ou os recomendados por órgãos internacionais como o *Codex Alimentarius*, os constantes nas Diretivas da União Européia e os utilizados pelo FDA/USA (BRASIL, 1999).

Quando nenhum resíduo é encontrado no alimento, após o uso dos agrotóxicos de acordo com as boas práticas agrícolas, o LMR é estabelecido no limite de quantificação do método analítico padrão. Com o avanço da instrumentação analítica, o limite de quantificação para vários compostos decresceu significativamente nas últimas décadas (CALDAS & SOUZA, 2000).

Alguns estudos têm demonstrado que a carne, o leite e seus derivados e os ovos são para o homem as principais fontes de exposição alimentar a alguns agrotóxicos e essa exposição pode ocorrer como consequência da aplicação direta de produtos químicos no animal ou quando estes ingerem

alimentos (pastagens, forragens e rações) que os contenham (CARVALHO et al, 1980). Devido às suas características físico-químicas, esses produtos químicos são veiculados pelas secreções, musculaturas e vísceras dos animais ou metabolizados antes ou depois da absorção pelo trato intestinal sendo excretados pela urina, fezes e glândulas mamárias, podendo levar à contaminação do leite e da carne (WHO, 1990). Tais resíduos podem atingir proporções bem acima dos níveis admitidos como "tolerância" e "seguros", com implicações toxicológicas para o homem, que é o último elo da cadeia alimentar (HUBER, 1975). A presença de resíduos de inseticidas tem dificultado a exportação do produto para mercados mais exigentes, como a Comunidade Européia, Rússia e Japão, grandes importadores de carne bovina do Brasil.

Porém é importante frisar que nem todos os compostos químicos aos quais os animais ficam expostos, deixam resíduos perigosos à saúde humana e animal e mesmo aqueles reconhecidos como potencialmente nocivos, somente permitem tal condição, quando ultrapassam o valor de concentração dado pelo LMR, que o alimento pode conter, sem prejuízo da integridade orgânica de seres humanos e animais (BRASIL, 1999)

1.3. O USO DE CARRAPATICIDAS EM REBANHOS BOVINOS

Dentre os parasitas encontrados em bovinos, o carrapato (*Boophilus microplus*), a mosca dos chifres e os vermes gastrointestinais podem ser considerados os de maior importância econômica (BRAGA, 2002), porém, o carrapato *Boophilus microplus* é considerado um dos principais ectoparasitas que acometem bovinos causando prejuízos à pecuária brasileira (WENZEL et al, 2004).

O controle do *B. microplus* é feito principalmente por meio de produtos químicos, aplicados sobre o animal, com objetivo de combater as fases parasitárias do carrapato. Porém, este método é caro devido aos custos das drogas e da mão de obra exigida para a sua aplicação.

Os carrapaticidas podem ser classificados em: de contato ou sistêmicos. Os carrapaticidas de contato são aplicados por meio de pulverização, imersão ou "pour-on" (lombo do animal). São divididos basicamente nos grupos:

aminidínicos, piretróides, fosforados, fenilpirazóis e cymiazol. Os carrapaticidas sistêmicos são aplicados por meio de injeções, atuando pela circulação sanguínea. O grupo mais conhecido é o das avermectinas. Esses produtos têm a desvantagem de serem contra-indicados para animais 30 dias antes do abate, ou em período de lactação, devido ao nível de resíduos que permanece no leite e na carne (EMBRAPA, 2000).

Os carrapaticidas de contato mais utilizados fazem parte da classe dos piretróides, que são compostos sintéticos muito utilizados na agropecuária em função de sua eficácia no controle de uma variedade de insetos e parasitas do gado. Eles apresentam estruturas semelhantes à piretrina, substância existente nas flores do *Pyrethrum* (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Dentre os vários carrapaticidas utilizados da classe dos piretróides, destacam-se: aletrina, resmetrina, deltametrina, cipermetrina e fenpropanato (WHO, 1990).

O uso de acaricidas químicos, que constitui o principal instrumento de controle do carrapato nos bovinos, a rigor busca a eliminação da infestação, diminuindo o contato entre o parasita e o animal, e os prejuízos diretos ou indiretos causados por estes. Porém o uso desses acaricidas apresenta como desvantagens a poluição de mananciais, a redução da população de insetos e outros organismos benéficos para a agropecuária e causam efeitos deletérios ao meio ambiente e ao homem e contaminam os produtos de origem animal.

Observou-se que a freqüente exposição dos carrapatos aos carrapaticidas tem levado a que as populações se acostumem com o produto, chegando ao ponto em que algumas delas não morrem quando os produtos são aplicados. É a chamada resistência dos carrapatos aos carrapaticidas (EMBRAPA, 2004). Logo, o manejo inadequado, na maioria dos casos, contribui substancialmente para o problema da resistência.

A utilização estratégica dos carrapaticidas (por exemplo: tratamentos a intervalos fixos de três semanas no início da primavera, em setembro, ou durante os meses mais quentes do ano) associada a práticas de manejo de pastagens, auxilia muito no retardo do desenvolvimento da resistência, reduzindo o nível de resíduo no leite e na carne conseqüentemente. Sabe-se que uma vez instalada a resistência a um grupo químico numa população de carrapatos, a primeira atitude é aumentar a concentração do produto para o qual a população de carrapatos é resistente, aumentando assim o risco de

contaminação do leite e da carne (BRAGA, 2002; LEAL et al, 2003).

1.4. PIRETRÓIDES

Os piretróides têm sido considerados como uma das classes de inseticidas e acaricidas mais utilizados na agricultura, pecuária, horticultura, silvicultura, e tratamentos domissanitários, estando presentes ainda em sprays de uso doméstico (VIEIRA, 2007). Estes compostos apresentam amplo espectro de atividade, ação rápida, eficiência em pequenas doses, baixo poder residual e, adicionalmente, são praticamente atóxicos para mamíferos, quando comparados a outros inseticidas (HIRATA, 1995), porém, estudos toxicológicos mostram que os piretróides estão entre os agrotóxicos mais tóxicos para organismos aquáticos (BARRIONUEVO & LANÇAS, 2001).

Estes inseticidas são lipofílicos, de ação prolongada, com ação neurotóxica atuando na transmissão axônica, interferindo no fluxo normal dos íons sódios envolvido na transmissão do impulso nervoso, levando os organismos à paralisia e morte (ANGERER & RITTER, 1997, SODERLUND et al, 2002).

Quando comparados com as piretrinas, os piretróides são mais eficientes no controle das pragas, mais estáveis e menos tóxicos ao meio ambiente (SODERLUND et al, 2002). São compostos que respeitado o intervalo de segurança, não deixam resíduos tóxicos ao meio ambiente, sendo necessárias pequenas quantidades para a aplicação.

Normalmente os piretróides são aplicados na parte aérea de culturas tais como: algodão, arroz, alho, batata, berinjela, tomate, etc. (ANVISA, 2008) ou aplicados por meio de pulverização, banhos de imersão ou “pour-on” para tratamento de ectoparasitas de bovinos. Os piretróides de maneira geral são utilizados também no controle dos insetos de broca-pequena-do-fruto, broca-grande-do-fruto, lagartas, grilos, bicheiras, etc. (SARAIVA, 2004).

Os piretróides, deltametrina e cipermetrina, são exemplos de piretróides utilizados no controle de carrapatos. As fórmulas estruturais destes compostos estão representadas nas Figuras 1.1 e 1.2 e suas propriedades físico-químicas

e os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pelo Codex Alimentarius em carne bovina são mostrados na Tabela 1.1.

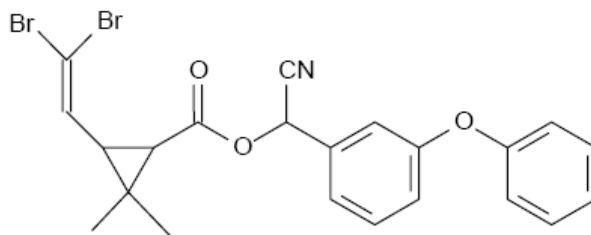


Figura 1.1. - Estrutura da (S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl(1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate (Deltametrina)

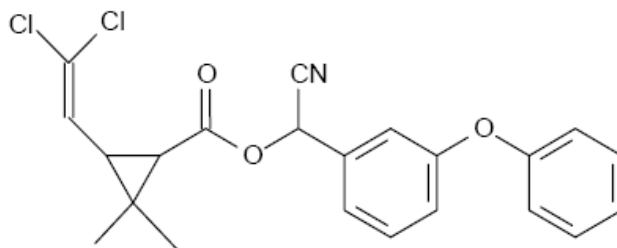


Figura 1.2. - Estrutura da (RS)- α -cyano-3-phenoxybenzyl(1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate (Cipermetrina)

Tabela 1.1. - Propriedades Físico-químicas dos piretróides deltametrina e cipermetrina e os LMR em Carne bovina e fígado

Piretróides	Massa molar g mol^{-1}	Solubilidade em água (mg L^{-1}) (20 °C)	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) Droga veterinária	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) Agrotóxico
Deltametrina	505	0,002	30,0* e 50,0**	500,0* e 30,0**
Cipermetrina	416	0,004	50,0	200,0

* carne bovina

(FAO/WHO, 2008)

** fígado

1.5. ORGANOCLORADOS

Os agrotóxicos organoclorados foram amplamente empregados contra pragas da agricultura e ectoparasitas bovinos. Estes compostos são extremamente tóxicos e apresentam elevada estabilidade e capacidade de bioacumulação. Muitos agrotóxicos desta classe tiveram seu uso proibido

devido à possibilidade de suas fórmulas favorecerem a formação de tumores cancerígenos ou causarem vários outros problemas à saúde humana (GALLI et al, 2006).

Embora eficientes, contribuem fortemente para o depósito de seus resíduos, principalmente na fração lipídica do próprio homem (HUBER, 1975). São considerados os mais persistentes e de sua degradação originam-se metabólitos também persistente e de efeitos nocivos (LARA & BATISTA, 1992).

O Endosulfan, inseticida desenvolvido pela Hoechst Aktiengesellschaft na Alemanha, foi introduzido no mercado em 1957 com o nome comercial de Thiodan (GOEBEL et al, 1982; STUMPF & ABHAVER, 1986). O ingrediente ativo do Endosulfan consiste na mistura de dois isômeros, sendo 70 % de α -endosulfan e 30 % de β -endosulfan. Entre os produtos derivados do metabolismo do Endosulfan em mamíferos, o sulfato de endosulfan é o principal metabólito devido à sua importância toxicológica. A Ingestão Diária Aceitável (IDA) de Endosulfan total (somatório de Endosulfan alfa, beta e sulfato) (Figura 1.3) para o homem foi estabelecida, em 1989, pelo *Joint Meeting on Pesticide Residue* (JMPR) em $0,006 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso corpóreo (DEEMA et al, 1966; DOROUGH & GIBSON, 1972; LEHR, 1992; STUMPF & ABHAVER, 1986; FAO/WHO, 1992).

O Endosulfan é um inseticida e acaricida que atua em uma grande variedade de insetos e ácaros. É utilizado principalmente em culturas alimentares, incluindo chá, café, frutas e legumes, arroz, milho, e outros grãos e viabiliza a produção das culturas. Sua utilização na pecuária não é autorizada, mas são encontrados resíduos na alimentação animal, sendo assim metabolizados e absorvidos, podendo ser encontrado na carne e no leite (FAO/WHO, 2008).

É praticamente insolúvel ($0,32 \text{ mg L}^{-1}$ a $22 \text{ }^\circ\text{C}$), sua massa molar é igual a $406,0 \text{ g mol}^{-1}$. O LMR é de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ em carne bovina e $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ em fígado bovino (FAO/WHO, 2008).

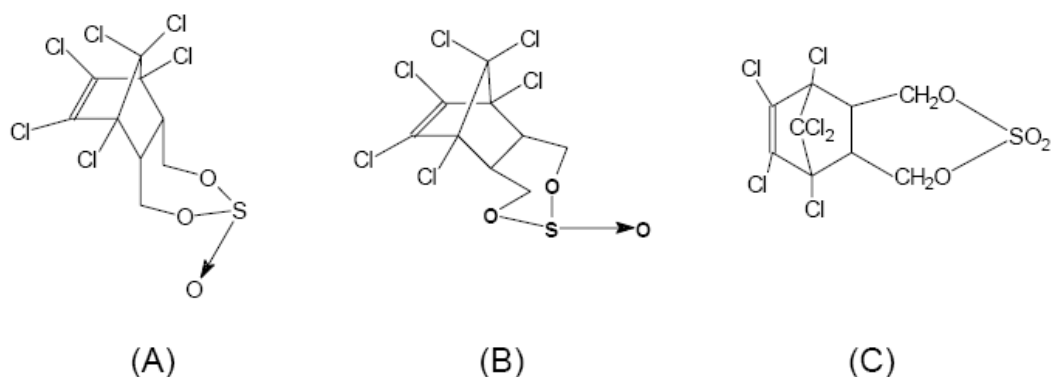


Figura 1.3. - Estruturas moleculares do 1,4,5,6,7,7-hexachloro-8,9,10-trinorborn-5-en-2,3-ylenbismethylene)sulfite - α -Endosulfan (A), β -Endosulfan (B) e Sulfato de Endosulfan (C)

1.6. ORGANOFOSFORADOS

Os agrotóxicos organofosforados constituem uma classe importante de inseticidas, acaricidas, nematicidas e fungicidas. São freqüentemente os preferidos nas lavouras, devido ao seu controle efetivo para uma ampla variedade de pragas. Embora estes compostos se degradem rapidamente em água, existe sempre a possibilidade de permanecerem resíduos e subprodutos em níveis relativamente nocivos para o consumo humano (SILVA et al, 1999).

Os compostos pertencentes à classe dos organofosforados apresentam o mecanismo de ação com inibição da enzima colinesterase, e conseqüente acúmulo de acetilcolina nas fibras nervosas, que impede a transmissão de novos impulsos gerando uma série de efeitos no organismo tais como convulsões, paradas respiratórias e coma. Apresenta um grau de toxicidade bastante elevado, porém, têm a vantagem de não apresentarem propriedades bioacumulativas e de serem menos persistentes no solo (SILVA et al, 2001; SILVA et al, 1999, LAMBROPOULOU & ALBANIS, 2002).

Os organofosforados são o grupo químico de agrotóxicos formado por ésteres de ácido fosfórico e outros ácidos à base de fósforo. Nesta classe destaca-se o Clorpirifós (Figura 1.4), com modo de ação de contato, ingestão e

fumigação. Inseticida utilizado como tratamento pré e pós-plantio para controlar insetos do solo, em culturas de milho, cereais, feijão, cebola, cenouras, nabos, alface e tabaco e como carrapaticida de contato (INCHEM, 1972).

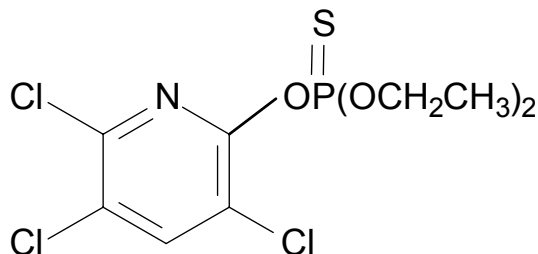


Figura 1.4. - Estrutura do O-3,5,6-tricloro-O,O-dietil-2-piridilfosforotioato - Clorpirifós

A preocupação com a presença de clorpirifós e seus produtos de degradação em alimentos tem motivado a realização de vários trabalhos, como por exemplo, o estudo de clorpirifós em casca e polpa de pepino (FERST, 1991), tomates (GOBO, 2001) e em diversos vegetais (VIANA et al, 1996), maçã (CELLA, 2002), etc.

O clorpirifós é um sólido cristalino de massa molar igual a 350,5 g mol⁻¹, ponto de fusão de aproximadamente 43 °C, apresenta baixa solubilidade em água (2,00 mg/L a 25 °C), não sendo sensível à radiação ultravioleta, é estável em soluções ácidas, porém hidrolisa em soluções básicas, é termicamente instável em temperaturas superiores a 50 °C (EXTOXNET, 2002). O LMR permitido em carne bovina é de 1,0 mg kg⁻¹ (FAO/WHO, 2008).

1.7. CARNE BOVINA

Entre os alimentos, a carne e seus derivados são amplamente consumidos, sendo, um alimento importante em várias dietas como fonte de proteínas de alta qualidade, ácidos graxos essenciais, vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina, biotina, ácido pantotênico, folacina, vitaminas B6 e B12) e minerais como ferro, zinco e fósforo.

A carne bovina é constituída de aproximadamente 75 % de água, 20 a 25 % de proteínas e em menor quantidade estão as vitaminas, os lipídeos, os

minerais e os carboidratos. Além do seu valor nutricional a carne apresenta todas as vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), as hidrossolúveis do complexo B e um pouco de vitamina C, que são responsáveis pela regulação dos processos fisiológicos e exercem funções indispensáveis ao crescimento e à manutenção do corpo humano.

A gordura presente na carne, além do aspecto energético, é importante devido à presença dos ácidos graxos essenciais, colesterol e vitaminas lipossolúveis.

Todos os minerais essenciais estão presentes na carne bovina, destacando-se a presença de ferro, fósforo, sódio, magnésio e zinco. Cabe destacar que a carne apresenta-se como fonte expressiva de ferro, onde de 40 a 60 % desse elemento é altamente absorvível (EMBRAPA, 1999).

Devido à utilização de carrapaticidas e drogas veterinárias pelos pecuaristas, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas capazes de detectar e quantificar os resíduos desses produtos e assim assegurar a qualidade alimentar.

1.8. METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

Geralmente, os alimentos e as amostras ambientais não podem ser analisados sem tratamento preliminar da amostra, porque os contaminantes se encontram muito diluídos e as matrizes são muito complexas. Devido aos baixos níveis de detecção requeridos pelas agências reguladoras e a natureza complexa das matrizes em que os componentes alvos estão presentes, o preparo da amostra, a detecção e as identificações em nível de traços são aspectos importantes dos métodos analíticos. A preparação da amostra, tal como a extração, concentração, e determinação dos analitos, influenciam extremamente na confiabilidade e exatidão da análise.

Devido ao fato de que as medidas são normalmente efetuadas em baixos níveis de concentração, as interferências são problemas freqüentes que devem ser considerados. O objetivo principal do preparo da amostra é, portanto, promover o fracionamento e o enriquecimento da mesma, com todos os analitos de interesse, e os deixar o mais livre possível das interferências

provenientes dos componentes da matriz, que certamente estarão no extrato. Qualquer perda do analito que ocorrer nessa etapa não pode ser compensada por nenhuma das etapas subseqüentes. Dessa maneira, o preparo da amostra é uma etapa crucial dentro de todo o processo analítico.

A principal dificuldade na extração de amostras da carne é a co-extração do material lipídico (ácidos graxos, esteróis, glicerídeos) da matriz que é incompatível com o sistema cromatográfico, por exemplo, o cromatógrafo a gás (CG). Uma etapa crítica, e geralmente o aspecto mais laborioso, no procedimento analítico é o *clean up* dos extratos.

Os métodos mais freqüentemente usados para determinar agrotóxicos em alimentos, em geral empregam a extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (EFS), extração sólido-líquido (ESL), extração com fluido supercrítico (EFS) e dispersão de matriz em fase sólida (DMFS) (GOBO et al, 2004). Estes métodos costumam empregar um grande número de "etapas de bancada", além do tempo de análise bastante elevado e grande consumo de solventes (NUNES et al, 2002).

Um método recentemente publicado, que utiliza as vantagens e possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna, é o método Quechers, o qual foi desenvolvido para gerar extratos que são diretamente aplicáveis tanto para análises por CG quanto por LC. O método Quechers é um procedimento simples e rápido, com baixo custo e consumo de solventes além de cobrir um amplo espectro de agrotóxicos extraídos (PIZZUTTI, 2006). Porém, para amostras de carne são mais relatadas etapas de *clean up* utilizando cromatografia por permeação em gel (CPG) e outras técnicas como partição líquido-líquido, EFS e precipitação a baixa temperatura tem sido revisada e comparada (JUHLER, 1997).

A análise dos extratos geralmente é feita por métodos cromatográficos. Estes são os mais utilizados por apresentarem um alto grau de precisão e determinação em níveis de nanogramas. Muitos agrotóxicos são voláteis e estáveis termicamente, sendo separados por cromatografia gasosa acoplada a sistemas de detecção seletivos e sensíveis, como detector por captura de elétrons, detector de nitrogênio – fósforo e espectrometria de massa (SANNINO et al, 2004, STOPPELLI & MAGALHÃES, 2005).

Os agrotóxicos não voláteis termolábeis e altamente polares têm surgido

nos últimos anos, incluindo carboxamidas, quinazolininas, pirimidinas, tiazol, carbamato, neonicotinóides e morfolina. Nestes casos, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa é largamente utilizada. A técnica de ionização em pressão atmosférica proporciona grande sensibilidade e seletividade (SANNINO et al, 2004, STOPPELLI & MAGALHÃES, 2005).

1.8.1. Extração Sólido-Líquido com Purificação em Baixa Temperatura

O método de precipitação em baixa temperatura foi desenvolvido para simplificar a etapa de *clean up*, utilizando solventes orgânicos menos tóxicos e prejudiciais, permitindo a quantificação em nível de ppb ($\mu\text{g kg}^{-1}$, $\mu\text{g L}^{-1}$) por cromatografia gasosa (JUHLER, 1997).

Utilizando como princípio a precipitação em baixa temperatura, Goulart (2004), desenvolveu uma metodologia, para extração e análise de deltametrina e cipermetrina em leite por cromatografia gasosa. Posteriormente, a mesma técnica foi aplicada para diversas matrizes, como por exemplo, solo e água (VIEIRA, 2005), batata (DARDENGO, 2007), tomate (PINHO, 2007) para extração simultânea de agrotóxicos das classes dos piretróides e organofosforados. A metodologia se mostrou simples e eficiente, além da vantagem de menor consumo de solventes, reduzindo ou evitando etapas de evaporação e troca de solventes.

O método consiste em colocar a amostra líquida ou sólida em contato com um solvente extrator, miscível em água. Posteriormente, a amostra é agitada e levada ao freezer por um período mínimo de seis horas. Nesta etapa, a fase aquosa juntamente com a amostra, congela ficando na parte inferior do recipiente utilizado e a fase superior contendo o solvente e os analitos extraídos são filtrados utilizando sulfato de sódio anidro com o intuito de eliminar possíveis resíduos de água. Finalmente, o extrato é analisado por cromatografia gasosa.

Apenas alguns solventes podem ser empregados nesta técnica, como a acetonitrila, o acetato de etila e a acetona, pois é necessário que o solvente forme uma mistura extratora homogênea, seja menos denso que a água e somente após o abaixamento da temperatura ocorra a separação das fases e

se mantenha líquido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A acetonitrila é o solvente mais utilizado porque apresenta todas as características listadas acima além de apresentar compatibilidade com a maioria dos analitos, com o preparo da amostra, na análise cromatográfica e pode ser empregada para analisar agrotóxicos de diferentes polaridades. A ESL-PBT apresenta como vantagens, além do baixo consumo de solvente, a ausência de outras etapas de *clean up*, muitas vezes requeridas em vários outros métodos de extração.

1.8.2. Dispersão de Matriz em Fase Sólida

A Dispersão de Matriz em Fase Sólida (DMFS) foi desenvolvida por Barker em 1989 (BARKER, 2000a e b) e têm encontrado aplicação particular como um processo analítico de preparação, extração e fracionamento de sólidos, semi-sólido e/ou amostras biológicas altamente viscosas.

Esta técnica foi utilizada por Ling & Huang (1995) em análise de agrotóxicos em alimentos para determinação de piretróides em vegetais. A maior vantagem desta técnica é que o processo de extração e *clean up* da amostra são realizados simultaneamente. Além disso, é uma técnica simples com baixo consumo de solventes, amostras e reagentes (ALBERO et al, 2003). A DMFS baseia-se em vários princípios simples de química e física, envolvendo forças aplicadas à amostra em mistura mecânica para produzir ruptura completa da amostra e as interações da matriz com um adsorvente sólido (EFS). Consiste em combinar pequena quantidade da matriz com um adsorvente (sílica, florisil, C_{18} , etc), misturar até homogeneização, transferir o material (matriz e adsorvente) para a coluna e submeter o sistema a uma eluição com um solvente apropriado. O filtrado é concentrado e analisado por cromatografia gasosa (LANÇAS, 2004; BARKER, 2000a e b).

Pode ser aplicado a diversos tipos de matrizes, como por exemplo, tecidos animais ou vegetais, ou amostras constituídas por material não homogêneo, matriz gordurosas e/ou outros tecidos, como as fibras e celulose, no caso das plantas.

1.9. CROMATOGRAFIA

Ao analisar uma amostra, freqüentemente, têm-se uma mistura de vários componentes em uma matriz complexa. Para amostras que contenham componentes desconhecidos, eles precisam ser separados dos demais, de modo que cada componente individual possa ser identificado e até mesmo quantificado por um determinado método analítico.

Os componentes dessa mistura podem ser separados utilizando as diferenças nas propriedades físicas e químicas dos componentes individuais. As propriedades físicas que permitem separar compostos são: *solubilidade, ponto de ebulição, pressão de vapor, densidade, tamanho das partículas, etc.*

Nas análises multirresíduos de agrotóxicos em alimentos, tradicionalmente, a Cromatografia gasosa (CG) ou a cromatografia líquida, acoplada ou não à Espectrometria de Massas (EM), têm sido as técnicas analíticas escolhidas, devido as suas excelentes características, de eficiência de separação cromatográfica e sensibilidade. Até o presente momento, os agrotóxicos investigados em amostras alimentares têm sido inseticidas, acaricidas e fungicidas, os quais, em geral, são analisados de forma adequada por CG (HERNÁNDEZ et al, 2005, PIZZUTTI, 2006).

O sistema de detecção utilizado em análise de resíduos em alimentos depende do tipo de substância a ser analisada, ou seja, quais elementos estão presentes nos ingredientes ativos dos agrotóxicos. O Detector por Captura de Elétrons (DCE) destina-se principalmente à análise de compostos que têm afinidade por elétrons como compostos halogenados, aldeídos conjugados, nitrilas, nitratos e organometálicos. Este detector possui a vantagem de ser um dos mais sensíveis entre todos os detectores, sendo possível com a sua utilização a detecção de 10^{-12} a 10^{-14} g de espécies eletroafins, porém, possui uma faixa de linearidade dinâmica relativamente pequena o que constitui um problema para as análises quantitativas.

1.10. EFEITO DE MATRIZ

A determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos constitui-se

um problema especial para a Química Analítica, visto que se deve determinar em níveis de traços, de microgramas (10^{-6}) a picogramas (10^{-12}), de uma determinada substância, seus metabólitos ou produtos de degradação, em presença de uma grande quantidade de material estranho, inerente da amostra. A presença de todos esses compostos, analitos e componentes da matriz, pode interferir durante a análise cromatográfica, influenciando na quantidade do analito que é transferido para a coluna. Esta interferência dos componentes da matriz, na quantificação dos analitos na análise cromatográfica, é denominada de efeito de matriz (GONZALEZ et al, 2002).

O efeito da matriz pode gerar sérios problemas analíticos, devido a possível superestimação da concentração dos analitos (ZROSTLÌKOVÁ et al, 2001) ou diminuição da resposta do detector de um analito presente no extrato da amostra comparado ao mesmo analito em solvente orgânico (HAJŠLOVÁ et al, 1998; EURACHEM, 1998; BRUCE et al, 1998; ZROSTLÌKOVÁ et al, 2001, THOMPSON et al, 2002; CARDOSO, 2008).

O efeito de matriz pode ocorrer em diversas partes do sistema cromatográfico como: injetor, coluna ou detector. No injetor o *liner* (tubo de vidro) é o principal responsável pelo efeito de matriz, pois os sítios ativos deste material podem adsorver ou induzir a degradação térmica de alguns analitos. Os sítios ativos são formados por grupos silanóis livres e metais potencialmente presentes na superfície do *liner*. Além disso, sítios ativos adicionais podem surgir a partir de co-extrativos não voláteis que se depositam na entrada do sistema cromatográfico durante repetidas análises (PINHO et al, 2008).

A Figura 1.5 apresenta um esquema geral do injetor de um CG:

- 1- Septo (silicone)
- 2- Alimentação de gás de arraste
- 3- Bloco metálico aquecido
- 4- Ponta da coluna cromatográfica
- 5- *liner* (sítios ativos)

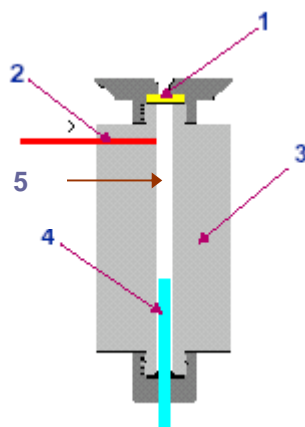


Figura 1.5. – Injetor de cromatógrafo a gás.

Quando as soluções padrão são preparadas no solvente puro e analisadas por cromatografia, os sítios ativos do *liner* estão disponíveis para interagir somente com os analitos, podendo ocorrer retenção destes analitos e, assim, menores quantidades são transferidas para a coluna e conseqüentemente detectadas. Entretanto, quando se analisa os extratos contendo esses analitos ocorre uma competição pelos sítios ativos do *liner*. Essa competição entre os compostos pelos sítios ativos, como mostrado na Figura 1.6, possibilita que maior quantidade de pesticida esteja disponível para ser introduzida na coluna cromatográfica e posteriormente, detectada. Quando a resposta do detector, atribuída ao analito, é comparada com a resposta de soluções-padrão do mesmo analito, ocorre uma superestimação dos resultados. (HAJSLOVÁ & ZROSTLIKOVA, 2003; PINHO et al, 2008). Um fato pouco relatado na literatura é a possível degradação dos analitos no *liner*, levando a diminuição da resposta para esse composto quando comparada a resposta do padrão em solvente.

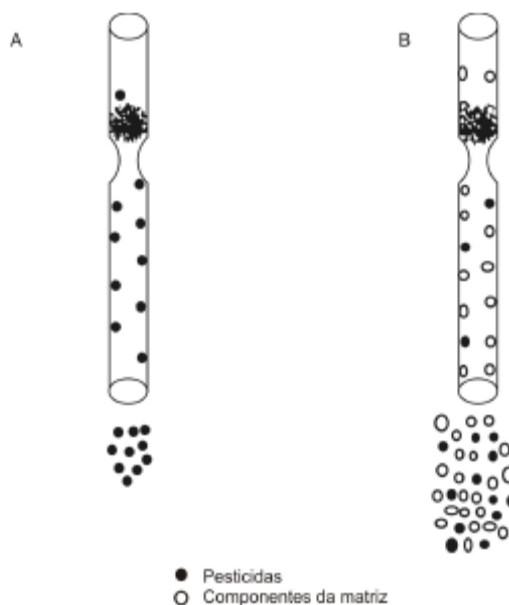


Figura 1.6 - Possíveis adsorções que ocorrem na superfície do vidro e lã de vidro do *liner* em uma injeção com divisão do fluxo (split). A) Agrotóxicos preparados em solvente puro. B) Agrotóxicos preparados em extratos da matriz (branco) (PINHO et al, 2008).

Os compostos analisados por cromatografia como os piretróides, os organoclorados e organofosforados, apresentam efeitos de matriz diferentes, relacionados às suas características físico-químicas como polaridade, volatilidade, estabilidade em altas temperatura, as condições cromatográficas e a natureza da matriz (MENKISSOGLU-SPIROUDI & FOTOPOULOU, 2004). Os piretróides, apesar de serem menos polares, apresentam efeito de matriz significativo. Neste caso, a elevada massa molar dos agrotóxicos (acima de 400 g mol^{-1}) dificulta a volatilização e menor quantidade de analito é introduzida na coluna cromatográfica quando preparado em solvente puro, produzindo menores respostas. Compostos hidrofóbicos, porém, como os agrotóxicos organoclorados, não apresentam efeito de matriz pronunciado. Estes compostos são menos susceptíveis à adsorção pelos sítios ativos do *liner*. Uma exceção é o DDT, que pode ser termicamente degradado no injetor após acúmulo de co-extrativos (SÁNCHEZ-BRUNETE et al, 2005; PINHO et al, 2008).

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), verificaram que quanto menor a concentração do analito na amostra, maior será o 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 analitos. O espectrômetro de massa também contribui para o aumento da resposta devido à superfície metálica do detector e o fato de não ocorrer combustão neste (SCHENCK & LEHOTAY, 2000).

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 agrotóxicos, durante a diluição das soluções padrão nas diversas concentrações (RIBANI et al, 2004). Muitos analitos têm se mostrado estáveis quando preparados em extratos da matriz (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, permitindo a entrada de maior quantidade de agrotóxicos na coluna cromatográfica, quando comparada com a técnica de injeção de vaporização no injetor. Porém, a injeção *on-column* ainda apresenta efeito de matriz, sendo atribuído à coluna cromatográfica e não à forma de injeção. A sua utilização requer maior freqüência de manutenção, sendo uma técnica impraticável para análise de rotina em matrizes complexas (ANASTASSIADES et al, 2003; PINHO et al, 2008).

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) e 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 analitos. Tais substâncias protetoras como o óleo de oliva (ou produtos de degradação destes) têm maior capacidade de fazer ligações de hidrogênio que os agrotóxicos com os grupos silanóis do *liner* (vidro). Desta forma, estes compostos mascaram os sítios ativos e proporcionam maior transferência dos analitos para a coluna (SANCHEZ-BRUNETE et al, 2005).

1.11. VALIDAÇÃO

Na área de análise de resíduos de agrotóxicos, o desenvolvimento de métodos analíticos constitui-se em uma etapa extremamente importante, onde a investigação deve sempre incluir a validação do método desenvolvido e não apenas a sua otimização, principalmente quando envolve sua aplicação em diferentes tipos de matrizes e não apenas estudos com solução padrão (BRITO et al, 2002).

Do ponto de vista prático, pode-se dizer que um método, após ser selecionado e desenvolvido, deve ser submetido a um processo de avaliação que estime sua eficiência e mérito. Este processo de avaliação costuma ser chamado de validação. Um método será considerado validado se suas características estiverem em conformidade com os pré-requisitos exigidos por literaturas de referência na área (IMOTO, 2004).

Os principais parâmetros a serem estudados durante o processo analítico da validação do método são seletividade, linearidade da resposta do detector e linearidade do método, Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez.

- Seletividade: capacidade de medir com exatidão e sem interferentes, vários analitos em uma mistura.
- Linearidade: capacidade de fornecer resultado proporcional à concentração do padrão, em uma faixa de trabalho apropriada.

A estimativa dos coeficientes de correlação de uma curva analítica permite avaliar a qualidade da curva obtida, que quanto mais perto de 1,0, menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados a e b.

Para validação de métodos para análise de resíduos de agrotóxicos, um valor de $r \geq 0,99$ é usualmente requerido, podendo ser considerado livre de tendências (*unbiased*), se o corredor de confiança da reta de regressão linear contiver a origem. A ANVISA (2003) estabelece que um coeficiente de correlação múltipla $r \geq 0,99$ é desejável, e o INMETRO (2003) um valor acima de 0,90.

- Limite de detecção (LD): representa a menor concentração do analito em exame que pode ser diferenciada do ruído do sistema com segurança, mas não necessariamente quantificada (RIBANI, 2004).

O Limite de detecção pode ser determinado das seguintes maneiras:

- a) Pelo método visual, em que se utiliza a adição de concentrações mínimas e conhecidas dos analitos em solvente, de maneira que se possa distinguir os sinais e a menor concentração visível detectável do ativo.
- b) Pelo método da relação sinal/ruído, em que pode ser aplicado em sistemas analíticos que apresentam o ruído da linha base como em cromatografia gasosa ou líquida, na proporção de 3:1.
- c) Pelos parâmetros da curva analítica, na qual pode ser expresso pela equação:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (1)$$

Onde,

s= estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação;

S= inclinação da curva ou coeficiente angular da curva analítica.

- Limite de quantificação (LQ): corresponde à menor quantidade do analito que pode ser quantificada com exatidão.

Pode ser determinado da mesma forma que o limite de detecção, porém, na relação sinal ruído utiliza-se a proporção 10:1, ou pelos parâmetros da curva utilizando a equação:

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (2)$$

Onde,

s= estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação;

S= inclinação da curva ou coeficiente angular da curva analítica.

- Exatidão: representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2003).

- Precisão: é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sob condições definidas (INMETRO, 2003). através de ensaios de repetitividade e precisão intermediária de resultados analisados de uma mesma amostra.

Expresso em termos de Coeficiente de variação (CV) para métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos CV de até 20 %, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI et al, 2004)

Em análise de resíduos de agrotóxicos, a validação do método de ensaio ocorre, usualmente, por meio de ensaios de recuperações intralaboratorial, ou seja, no próprio laboratório onde se deseja validar o método (THIER & ZEUMER, 1987).

- Robustez - A capacidade do método em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos, sendo realizadas sob pequenas mudanças nas condições analíticas.

1.12. OBJETIVOS

1.12.1. Objetivos Gerais:

- Analisar resíduos de agrotóxicos em carne bovina por cromatografia gasosa.
- Otimizar e validar uma metodologia para a extração e análise multirresíduo (deltametrina, cipermetrina, endosulfan e clorpirifós) em carne bovina.

1.12.2. Objetivos específicos:

- Estabelecer as condições de análise da deltametrina, endosulfan, clorpirifós e cipermetrina por cromatografia gasosa.
-

- Otimizar a análise de multirresíduo em amostras de fígado e músculo bovino fortificados, empregando as Técnicas de Extração Sólido – Líquido com Purificação em Baixa Temperatura (ESL-PBT).
- Validar a metodologia otimizada para determinação dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina em carne bovina
- Avaliar a técnica DMFS em amostras de fígado e músculo bovino e comparar com a ESL-PBT otimizada.
- Empregar a metodologia otimizada para a extração e quantificação dos multirresíduo em amostras de fígado e músculo bovino obtidos no comércio de Viçosa.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. PREPARO DE SOLUÇÕES PADRÃO

As soluções padrão dos princípios ativos foram preparadas a partir de padrões de clorpirifós (99,0 % m/m – Chem Service), cipermetrina (92,4 % m/m – Chem Service), deltametrina (99,0 % m/m – Chem Service) e endosulfan (91,5 % m/m). Uma solução estoque de 1.000,0 mg L⁻¹ de cada um dos compostos foi preparada em acetonitrila (Vetec/HPLC). A solução de trabalho contendo os quatro agrotóxicos de interesse na concentração de 10,0 mg L⁻¹, foi preparada em acetonitrila a partir da diluição da solução estoque. As demais soluções foram obtidas a partir da diluição da solução de 10,0 mg L⁻¹.

Uma solução de bifentrina (92,2 % m/m – FMC do Brasil) a 10,0 mg L⁻¹, utilizada como padrão interno, foi preparada em acetonitrila, a partir de uma solução estoque desse princípio ativo a 1000,0 mg L⁻¹.

2.2. AMOSTRAS DE CARNE

Devido à aplicação por pulverização de carrapaticidas sobre o lombo do animal e possível contaminação proveniente da alimentação, podendo assim, ocorrer veiculação e acúmulo dos princípios ativos na musculatura e vísceras dos animais, levando a contaminação da carne e do leite, escolheu-se trabalhar com amostras de músculo (alcatra) e fígado bovino.

Para o processo de otimização e validação da metodologia de análise multirresíduo dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina, foram utilizadas amostras de carnes provenientes do comércio de

Viçosa – MG, cuja presença dos agrotóxicos foi previamente avaliada pela análise dos extratos obtidos de amostra não fortificada, denominada branco.

À temperatura ambiente as amostras de carne foram cortadas e trituradas em liquidificador por aproximadamente 3 minutos. Em seguida, a carne foi acondicionada em potes plásticos de PET, vedadas, identificadas e armazenadas em freezer a -20 °C. No momento da análise, as amostras foram deixadas à temperatura ambiente até descongelarem.

2.3. EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA – ESL-PBT

2.3.1. Fortificação das amostras de carne

Amostras de carne bovina (alcatra e fígado) de massas igual a 3,0000 g, medidas em balança analítica (Sartorius BP 2215 com precisão de 1×10^{-4} g), foram fortificadas, com 0,10 mL da solução de trabalho contendo os quatro agrotóxicos na concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, a fim de se obter no extrato final, após a extração, uma concentração igual a $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ de cada analito.

Após adição dos analitos, as amostras foram levadas ao ultra-som (Unique, MAXICLEAN 750) por 3 minutos e deixadas em repouso por aproximadamente 30 minutos para que houvesse maior interação dos agrotóxicos com a amostra. Posteriormente, estas amostras foram submetidas aos procedimentos de extração, e foram determinadas as condições ótimas para análise dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina, por cromatografia gasosa.

2.3.2. Extração dos agrotóxicos em carne bovina por ESL-PBT – Técnica geral

Os ensaios da extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura para análise dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina em amostras de carne bovina foram adaptadas da técnica descrita para extração de deltametrina e cipermetrina em leite (GOULART, 2004) e para

extração de piretróides e organoclorado em tomate (PINHO, 2007, PINHO et al, 2008).

3,0000 g das amostras fortificadas foram medidas (Balança analítica Sartorius BP 2215 com precisão de 1×10^{-4} g) em frascos de vidro transparente com tampa plástica (30 mL de capacidade). A estas amostras foram adicionados 9,0 mL de solvente extrator (água, acetonitrila, acetato de etila). A mistura obtida foi mantida sob agitação em uma mesa agitadora (Tecnal TE - 420) a 25 °C e a 175 oscilações por minuto (opm). A composição do solvente extrator, a força iônica, o tempo e o tipo de agitação foram otimizados posteriormente para se obter melhor eficiência na extração dos princípios ativos. Após agitação as amostras foram colocadas em freezer a -20 °C, por 12 horas. Após este período, a amostra congelada foi descartada e a fase orgânica líquida separada por filtração simples em papel de filtro contendo 1,0 g de sulfato de sódio anidro (Vetec – PA), sendo o papel de filtro previamente lavado com acetonitrila resfriada. Os volumes dos extratos obtidos foram ajustados em balões volumétricos para 10,0 mL com acetonitrila, transferidos e armazenados em frascos de vidro no freezer até o momento da análise cromatográfica.

2.3.3. Otimização da técnica extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT)

No processo de otimização da técnica ESL-PBT as condições de análise dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina em carne foram avaliadas procurando-se obter os melhores rendimentos com menor tempo. Alguns parâmetros que influenciam os resultados no processo de extração foram avaliados usando amostras de carne (alcatra e fígado bovino) fortificadas. A quantificação dos analitos foi realizada por cromatografia gasosa empregando detecção por captura de elétrons (CG-ECD) utilizando o método do padrão interno.

Porém, antes da realização das etapas de otimização, alguns estudos preliminares (2.3.3.1) foram realizados, de modo que esta fosse executada de uma forma mais simples e eficiente.

2.3.3.1. Ensaio preliminares

Um dos estudos preliminares teve como objetivo determinar a quantidade de amostra de carne necessária no processo de ESL-PBT. Para esse estudo, massas de 2,0000; 3,0000 e 4,0000 g foram medidas separadamente (Balança analítica Sartorius BP 2215 com precisão de 1×10^{-4} g) em frascos de vidro transparente com tampa de plástico (30,0 mL capacidade) e fortificadas como descrito no item 2.3.1 a fim de se obter no extrato final, após a extração, uma concentração igual a $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ de cada analito para todas as massas trabalhadas.

A avaliação da massa foi realizada tanto para amostras de alcatra como de fígado bovino empregando a técnica ESL-PBT descrita no item 2.3.2.

Outro estudo preliminar teve como objetivo determinar o tempo de contato dos ingredientes ativos com a carne no processo de fortificação das amostras. Para isso, a amostra *in natura* descongelada foi fortificada como descrito no item 2.3.1 variando-se o período em que os analitos estavam em contato com a amostra de carne após sonicação de 3 minutos, ao ar e em temperatura ambiente (aproximadamente $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$) em: 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 horas. Decorrido o intervalo de tempo estipulado para as amostras, essas foram submetidas a técnica ESL-PBT descrita no item 2.3.2, sendo determinado o intervalo de tempo ideal para fortificação das amostras de carne.

2.3.4. Planejamento fatorial 2^3

Goulart (2004) e Vieira et al (2007) recomendam na descrição da metodologia usar 8,0 mL de uma mistura extratora contendo acetonitrila (6,5 mL) e acetato de etila (1,5 mL), na extração de piretróides em leite, água e solo. Esta mistura, nessa proporção, permite formar uma fase única com 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 agrotóxicos (MASTOVSKA & LEHOTAY, 2004), tem as características necessárias para ser usada na técnica de ESL-PBT. 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 podem ser feitas pela adição de acetato de etila ou metano e a proporção entre os solventes extratores não podem alterar as características da mistura extratora com relação à formação da fase única e das características de congelamento (PINHO, 2007).

Não se encontrou nenhum estudo sistemático realizado para extração de agrotóxicos em amostras de carne utilizando a técnica ESL-PBT. Assim, na otimização do método para amostras de carne, foi estabelecida a composição da mistura extratora e a força iônica, de forma que a mistura extratora mantivesse as características necessárias para extração e o tempo e tipo de agitação.

Para uma avaliação mais precisa da influência dessas variáveis no rendimento da extração, foi realizado um planejamento experimental completo 2^3 para avaliar a eficiência e a influência de determinados parâmetros no processo de extração. As variáveis independentes testadas em dois níveis, representados por (-) e (+), foram tempos de agitação (t_a): 30 e 45 min; força iônica (f_i): 0,00 e 0,20 mol L⁻¹ de NaCl; e composição do solvente extrator (se): A e B. Os solventes extratores foram constituídos de diferentes proporções de água / acetonitrila / acetato de etila: Solvente A: 1 / 8,0 / 0,0; solvente B: 1 / 6,5 / 1,5. A variável dependente foi o rendimento de extração obtidos em cada ensaio.

Foram realizados 16 ensaios, que corresponderam a todas as combinações possíveis para os níveis (-) e (+) com uma repetição. Na Tabela 1 está representado o planejamento fatorial 2^3 , com os três fatores codificados $F(\alpha)$; $F(\beta)$ e $F(\gamma)$ em dois níveis (-1) e (1).

As porcentagens de recuperação obtidas no experimento para cada um dos agrotóxicos foram utilizadas para avaliar os efeitos de cada fator e suas interações sendo, avaliadas estatisticamente pelo programa STATISTICA®.

Tabela 2.1. - Planejamento fatorial 2^3 para as amostras de carne bovina fortificadas.

Ensaio	Fatores codificados			Fatores originais		
	F(1)	F(2)	F(3)	(1) Tempo de agitação (min)	(2) Força iônica Na ⁺ (mol L ⁻¹)	(3) Solvente extrator
1 e 2	-	-	-	30	0,00	A
3 e 4	+	-	-	45	0,00	A
5 e 6	-	+	-	30	0,20	A
7 e 8	+	+	-	45	0,20	A
9 e 10	-	-	+	30	0,00	B
11 e 12	+	-	+	45	0,00	B
13 e 14	-	+	+	30	0,20	B
15 e 16	+	+	+	45	0,20	B

F1 = Tempo de agitação (min), F2 = Força iônica (solução de NaCl) mol L⁻¹, F3 = Solvente extrator A (1,0 mL de água, 8,0 mL de acetonitrila e 0,0 mL de acetato de etila) e B (1,0 mL de água, 6,5 mL de acetonitrila e 1,5 mL de acetato de etila).

O planejamento fatorial foi aplicado tanto para amostras de alcatra como de fígado, cada um dos ensaios foi realizado com 3,0000 g de amostra fortificada (2.3.1) e empregando-se a técnica geral de extração ESL-PBT descrita no item 2.3.2.

2.3.5. Efeito do ultra-som na eficiência de extração dos analitos em carne bovina

Com as condições otimizadas, avaliou-se o efeito das ondas ultra-sônicas na extração dos agrotóxicos em carne bovina. Realizou-se testes em amostras previamente fortificadas de acordo com o item 2.3.1, que foram extraídas com as misturas de solventes B para carne bovina tipo alcatra e mistura de solventes A para o fígado bovino durante 5, 10 e 15 minutos de banho ultra-sônico e submetidas às etapas subseqüentes descritas no item 2.3.2.

Para efeito de comparação, foi realizada simultaneamente uma extração empregando 30 minutos de agitação em uma mesa agitadora (Tecnal TE - 420) a 25 °C e a 175 oscilações por minuto (opm).

As etapas posteriores, tais como, congelamento e passagem por papel de filtro com sulfato de sódio anidro, foram idênticas às descritas no item 2.2.2.

2.3.6. Eficiência de adsorventes no *clean up* dos extratos obtidos na ESL-PBT de amostras de carne bovina

Os extratos orgânicos obtidos após a ESL-PBT de amostras de fígado bovino 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 filtrada sob gravidade em cartucho de polietileno contendo 1,0000 g de sulfato de sódio anidro e 1,5000 g de adsorvente na camada inferior, massa essa escolhida para trabalhar com um proporção amostra:adsorvente igual a 2:1. Os extratos foram recuperados para 10,0 mL em acetonitrila e armazenadas em freezer até o momento da análise cromatográfica. Os adsorventes avaliados foram florisil (J. Barcker) e sílica (Mercker), escolhidos devido ao menor custo e maior disponibilidade.

Com o objetivo de avaliar qual metodologia remove a cor dos extratos de forma mais efetiva, foi avaliada a intensidade da cor dos extratos das amostras de fígado. Foram analisadas por espectrofotometria amostras que foram submetidas a técnica ESL-PBT, ESL-PBT e *clean up* com filtração em adsorventes (florisil ou sílica), DMFS com os adsorventes florisil ou sílica (procedimento descrito posteriormente no item 2.4). Foi realizada uma varredura na região do UV-visível de 250 a 780 nm utilizando um espectrofotômetro HITACHI, U-1100.

Também foi estudado o *clean up* dos extratos com adição de 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.

2.4. DISPERSÃO DE MATRIZ EM FASE SÓLIDA – DMFS

2.4.1. Fortificação das amostras de carne

Uma pequena quantidade de amostra (0,5000 g para carne tipo alcatra e fígado bovino), foi fortificada, com 0,010 mL da solução de trabalho contendo os quatro agrotóxicos na concentração de 10,0 mg L⁻¹, a fim de se obter no extrato final (1,0 mL), após a extração, uma concentração igual a 0,10 mg L⁻¹ de cada analito.

Após adição dos analitos, as amostras foram levadas ao ultra-som (Unique, MAXICLEAN 750) por 3 minutos e deixadas em repouso por aproximadamente 30 minutos para que houvesse maior interação dos agrotóxicos com a amostra.

2.4.2. Extração dos agrotóxicos em carne bovina por DMFS – Técnica Geral

Amostras de alcatra e fígado fortificado (item 2.4.1), de massa igual a 0,5000g (Balança analítica Sartorius BP 2215 com precisão de 1 x 10⁻⁴ g), foram colocadas em cadinhos de teflon onde foram acrescentados 0,5000 g de adsorvente, condicionado em acetonitrila. Esta mistura foi macerada 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 sulfato de sódio anidro retido por lã de vidro.

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

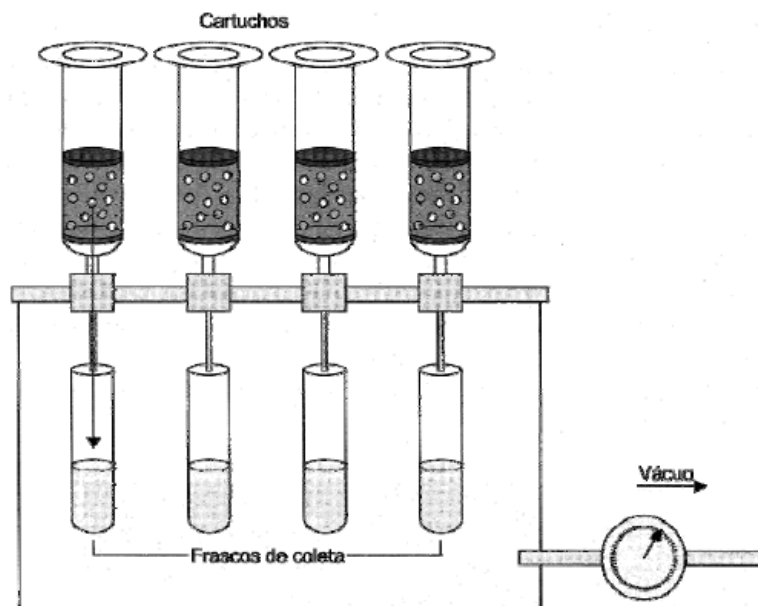


Figura 2.1. – Representação da eluição de cartuchos de polietileno contendo amostras dispersas em uma fase sólida.

Em uma vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, aproximadamente, adicionaram-se $10,0 \text{ mL}$ de solvente ao cartucho. Ao extrato coletado acrescentou-se $0,010 \text{ mL}$ da solução de bifentrina (padrão interno) a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$. Evaporou-se o solvente sob corrente de ar e o extrato foi recuperado em $1,0 \text{ mL}$ de acetonitrila para análise por cromatografia gasosa.

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

O procedimento descrito no item 2.4.2 foi empregado para avaliar a influência de dois adsorventes, sílica e florissil, e três eluentes, acetato de etila, acetonitrila e a mistura hexano:acetona, na porcentagem de recuperação dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina e na remoção de componentes da matriz, como mostrado na tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Adsorventes e eluentes avaliados na otimização da DMFS

Ensaio	Adsorventes	Eluentes
1	Sílica	Acetato de Etila
2	Sílica	Acetonitrila
3	Sílica	Hexano:Acetona (9:1)
4	Florisil	Acetato de Etila
5	Florisil	Acetonitrila
6	Florisil	Hexano:Acetona (9:1)

Os ensaios foram realizados em triplicatas. Cada combinação de adsorvente e eluente foi acompanhada de um branco (extrato da matriz isenta de agrotóxicos).

2.5. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

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

As condições analíticas otimizadas para as análises, tais como, temperatura da coluna, do injetor e do detector, vazão dos gases e escolha do tipo de coluna cromatográfica, foram determinadas visando um pequeno tempo de análise, com uma boa resolução e separação entre os picos dos agrotóxicos de interesse.

Os padrões de clorpirifós, endosulfan, deltametrina e cipermetrina foram analisados por CG-EM, com o objetivo de confirmar a identificação dos princípios ativos e a pureza para serem utilizados na metodologia ESL-PBT.

Essa determinação foi realizada em um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-17A equipado com um espectrômetro de massa (EM). As condições ideais para análise foram semelhantes à utilizada no CG-ECD, porém, utilizando gás hélio.

2.6. Análise quantitativa dos agrotóxicos em carne bovina

A identificação dos agrotóxicos (clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina) nos extratos foi realizada pelo tempo de retenção dos mesmos nos seus cromatogramas, comparando com os da solução padrão contendo os mesmos princípios ativos.

A quantificação foi realizada utilizando o método da padronização interna. Soluções padrão de concentrações crescentes dos analitos (5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 125,0 250,0; 375,0; 500,0; 650,0; 750,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), contendo como padrão interno (PI) bifentrina 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, foram analisadas no cromatógrafo a gás nas condições analíticas pré-determinadas. Construíram-se curvas analíticas, uma para cada princípio ativo, relacionando a razão entre as áreas do pico atribuído à substância de interesse e a área do pico do padrão interno (área do analito/área do padrão interno de concentração constante) com a concentração (variável) do analito.

Através da regressão linear destas curvas analíticas, foram obtidas equações da reta que foram utilizadas para calcular as concentrações dos agrotóxicos nas amostras. Os extratos das amostras antes das análises, também receberam a adição de padrão interno (mesma quantidade e concentração adicionado nas soluções padrão), permitindo pela razão das áreas determinar a concentração dos compostos presentes.

2.7. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

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

O procedimento realizado para validação do método proposto foi feito baseando-se nas recomendações do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2003), RIBANI e

colaboradores (2004), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (AGARP, 1999).

2.7.1. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da comparação de cromatogramas dos extratos obtidos após a extração das amostras de alcatra e fígado bovino isenta dos inseticidas clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina com os cromatogramas dos extratos obtidos da matriz fortificada submetida ao procedimento otimizado.

2.7.2. Linearidade de resposta do método proposto

A linearidade de resposta do método proposto foi determinada pela injeção de extratos obtidos de amostras fortificados com os princípios ativos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina em acetonitrila em concentrações crescentes: 10,0; 20,0; 30,0; 50,0; 100,0; 120,0 e 150,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para alcatra e 15,0; 30,0; 45,0; 75,0; 100,0; 120,0 e 150,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para fígado bovino. Em todas as soluções foram adicionados 0,10 mL da solução padrão de bifentrina 10,0 mg L^{-1} , utilizado como padrão interno. Após a análise cromatográfica, foram construídas curvas analíticas, relacionando as razões da área do analito e do padrão interno com as concentrações dos produtos estudados, conforme o procedimento descrito no item 2.5. A linearidade foi avaliada, através da regressão linear destas curvas analíticas.

2.7.3. Limite de detecção e limite de quantificação do CG-DCE

Os Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada um dos agrotóxicos foram determinados usando o método da relação sinal/ruído, onde a menor concentração detectada ou quantificada deve ser aquela onde a área é 3 e 10 vezes, respectivamente, a área do ruído do equipamento.

Foram injetadas extratos de amostras fortificadas com os princípios ativos, clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina em acetonitrila e em

concentrações decrescentes de 15,0; 10,0; 5,0 e 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, até ser observada a relação sinal/ruído nas proporções de 3:1 e 10:1.

2.7.4. Precisão

A precisão do método ESL-PBT em alcatra e fígado bovino, foi estimada por um estudo intralaboratorial, avaliando-se a repetitividade e a precisão intermediária.

2.7.4.1. Repetitividade

A repetitividade do método ESL-PBT para análise de resíduos dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina em carne bovina, foi determinada realizando-se a extração dos agrotóxicos de amostras fortificadas com concentrações próximas ao LMR para cada analito (50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) seguindo o procedimento otimizado, em sete repetições, para o cálculo da estimativa do desvio padrão relativo, conforme recomendações do INMETRO (2003).

2.7.4.2. Precisão intermediária

Para determinar a precisão intermediária do método ESL-PBT, foi efetuada em triplicatas, nas condições pré-estabelecidas no item 2.3.8, a extração dos quatro inseticidas de interesse de amostras de carne bovina fortificada (50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) em três dias diferentes (1°, 7°, 30° dia). A precisão intermediária foi avaliada pela porcentagem de recuperação, do desvio padrão e do coeficiente de variação, determinados para cada ensaio.

2.7.5. Exatidão

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

2.7.5.1. Ensaio de recuperação

Nos ensaios de recuperação as substâncias de interesse foram adicionadas à alcatra e ao fígado bovino em concentrações próximas a 1, 2 e 5 vezes o limite de quantificação (LQ) do CG-DCE (item 2.5.3). Desta forma, os testes foram realizados extraindo-se conforme o procedimento descrito no item 2.3.8, os analitos das amostras de carne bovina (alcatra e fígado). Os valores das recuperações obtidas nos ensaios foram utilizados para avaliar este parâmetro.

2.8. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ NA PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DOS AGROTÓXICOS

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

2.8.1. Superposição de matriz

Quando soluções padrão preparadas em solvente puro e analisadas por cromatografia gasosa, apresentam respostas diferentes das mesmas soluções padrão preparadas no extrato da matriz, isenta dos agrotóxicos, caracteriza-se o efeito de matriz. Para avaliar essa influência dos compostos na matriz na resposta do detector foram preparadas duas séries de soluções padrão contendo os quatro agrotóxicos nas concentrações de 5,0; 10,0; 25,0; 75,0; 150,0; 300,0; 500,0; 625,0 e 750,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. A primeira série foi preparada pela diluição da solução de trabalho (10,0 mg L^{-1}) contendo os quatro analitos 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 carnes (alcatra ou fígado) isentas dos princípios ativos.

2.8.2. Variação da resposta do detector em função da saturação do sistema de injeção

A variação da resposta do detector foi avaliada pela área de cada agrotóxico antes e após a saturação do sistema com os co-extrativos da matriz foi utilizada para estudar o efeito de matriz na determinação de resíduos de agrotóxicos em carne. Foi avaliada pela comparação dos resultados de três injeções sucessivas de uma solução padrão $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila, seguida de cinco injeções sucessivas de um extrato obtido da ESL-PBT de amostras de carne bovina (alcatra ou fígado) isentas dos analitos. Com o sistema cromatográfico saturado foram injetadas três vezes a solução padrão $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila e as respostas do clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina antes e após a saturação com os extratos da matriz foram comparadas.

2.9. APLICAÇÃO DA TÉCNICA ESL-PBT EM AMOSTRAS DO COMÉRCIO DE VIÇOSA-MG

A técnica ESL-PBT para determinação dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina otimizada e validada, foi aplicada em amostras de alcatra e fígado bovino coletadas no comércio local da cidade de Viçosa, estado de Minas Gerais.

Após o recebimento das amostras, essas foram trituradas até que uma massa homogênea fosse obtida e foram acondicionadas em potes de polietileno, vedadas, identificadas e conservadas em freezer, no momento da extração as amostras foram deixadas à temperatura do ambiente (aproximadamente $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$) até descongelarem. Alíquotas de $3,0000 \text{ g}$ foram retiradas e submetidas ao processo de extração, os extratos obtidos foram analisados no CG-DCE. Todas as análises foram realizadas em triplicatas, tomando-se cuidado especial na limpeza do material utilizado. Vidrarias e liquidificador foram lavados com detergente, água corrente, água destilada e acetona, aplicada com o auxílio de uma pisseta após a trituração de cada amostra.

O restante das amostras processadas foi acondicionado em recipientes

plásticos, identificadas e armazenadas à temperatura de -20 °C, para eventual necessidade de repetição do processo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Para separação, identificação e quantificação dos resíduos de agrotóxicos nos extratos de carne, foi utilizada cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons. Devido ao alto poder de resolução da técnica cromatográfica e alta sensibilidade do detector aos compostos halogenados, foi possível quantificar os princípios ativos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina. Inicialmente foram estabelecidas as condições cromatográficas, otimizadas as temperaturas do injetor, da coluna, do detector e fluxo de gás de arraste, de forma que, possibilitassem uma boa separação dos compostos avaliados.

As condições ideais determinadas para análise cromatográfica foram:

- Coluna capilar Agilent Technologies DB-5 com fase estacionária composta de 5 % de fenil e 95 % de dimetilpolisiloxano, 30 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e 0,1 μm de espessura de filme.
- Programação 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 (DCE): 300 °C
- Volume injetado: 1,0 μL
- Gás de arraste: Nitrogênio
- Vazão do gás de arraste: 1,2 mL min⁻¹
- Divisão de fluxo: 1:5

Os agrotóxicos estudados foram identificados pela comparação do tempo de retenção dos compostos de interesse com os dos padrões dessas substâncias, analisadas nas mesmas condições cromatográficas.

A análise cromatográfica dos padrões e da amostra foi realizada de acordo com as condições descritas acima. Na Figura 3.1, está apresentado um cromatograma obtido pela análise de uma solução padrão na concentração de $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila, com o tempo de análise de 10 minutos.

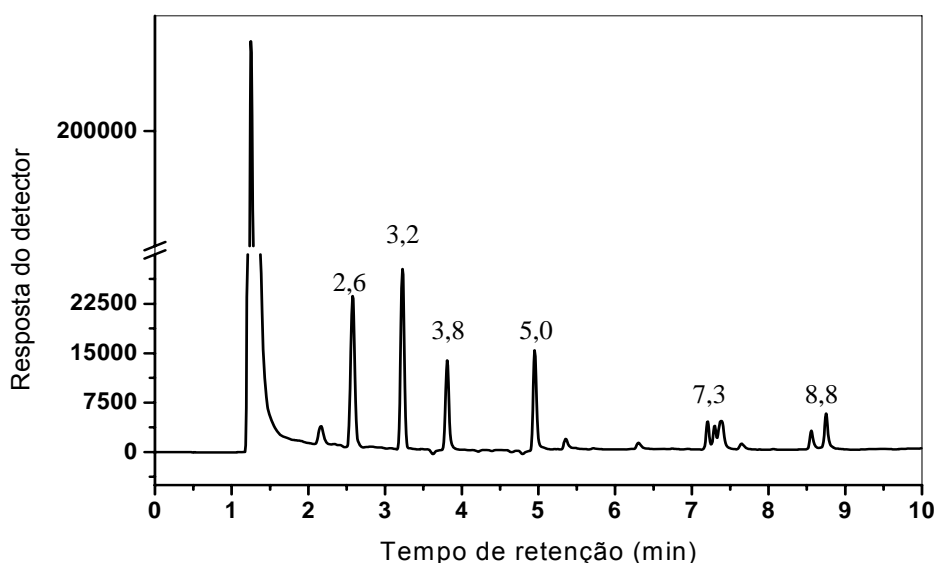


Figura 3.1. – Cromatograma de uma solução padrão de $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$ dos princípios ativos em acetonitrila, onde $t_R = 2,6$: clorpirifós, $t_R = 3,3$: α -endosulfan, $t_R = 3,8$: β -endosulfan, $t_R = 5,0$: bifentrina (PI), $t_R = 7,3$: cipermetrina, $t_R = 8,8$: deltametrina.

Os picos com tempo de retenção, t_R , iguais a 2,6; 3,3; 3,8; 7,3 e 8,8 correspondem aos agrotóxicos clorpirifós, α -endosulfan, β -endosulfan, cipermetrina e a deltametrina, respectivamente e o pico com t_R igual a 5,0 corresponde ao padrão interno bifentrina. A ordem de eluição foi definida pela massa molar e pressão de vapor crescentes dos compostos entre outras propriedades físicas.

A presença de mais de um pico para cada agrotóxico está relacionado com a conversão em isômeros durante a injeção no cromatógrafo (MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004). Dessa maneira, considerou-se como o valor de área para endosulfan, cipermetrina e deltametrina, a soma das áreas dos picos dos seus isômeros.

Análises por CG-EM permitiram confirmar os princípios ativos utilizados e a pureza dos mesmos, sendo as soluções de trabalho, obtidas a partir da diluição das soluções estoques dos padrões, utilizadas na fortificação das amostras de carne bovina durante a execução do trabalho.

Através das condições cromatográficas estabelecidas foi possível separar os agrotóxicos estudados, com pequeno tempo de análise e boa separação dos analitos estudados

3.2. CURVAS ANALÍTICAS E LINEARIDADE DA RESPOSTA DO DETECTOR

A quantificação dos quatro agrotóxicos foi realizada pelo método do padrão interno, onde se relaciona a concentração dos analitos com a razão das áreas dos agrotóxicos/área do padrão interno.

O padrão interno tem sido utilizado para diminuir erros no volume de injeção, pequenas variações no fluxo do gás de arraste e na temperatura da coluna, não afetando assim, significativamente as respostas cromatográficas.

A bifentrina foi o piretróide escolhido como padrão interno, por ser um analito semelhante às substâncias quantificadas, possui o tempo de retenção próximo, não faz parte da amostra, não reage com os componentes da matriz e não degrada. O padrão utilizado apresentou elevado grau de pureza, possui pico com boa resolução e separação nas condições cromatográficas e dificilmente é encontrado em amostras de carne.

As curvas analíticas (Figura 3.2) foram construídas através da injeção de padrão de clorpirifós, endosulfan, deltametrina, cipermetrina e bifentrina em concentrações crescentes (10,0 a 750,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) e analisadas nas condições analíticas pré-estabelecidas.

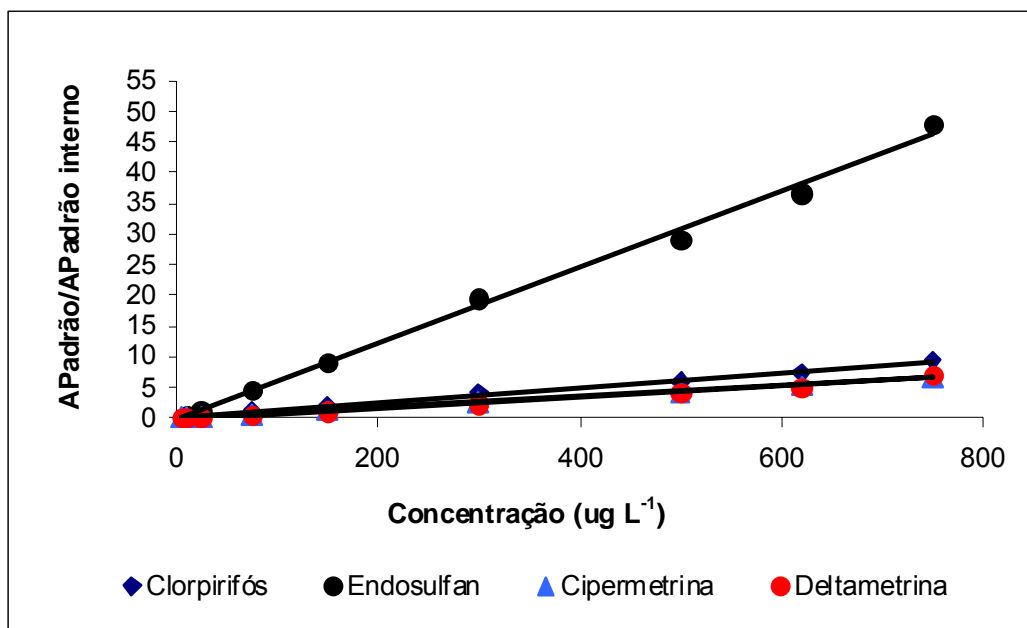


Figura 3.2. – Curvas analíticas dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina utilizando como padrão interno (PI) a bifentrina.

A Linearidade da resposta do detector do sistema de detecção foi verificada através da regressão linear dos dados das curvas analíticas (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. - Parâmetros das curvas analíticas obtidas para os quatro agrotóxicos estudados.

Analitos	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)
Clorpirifós	$Y = 0,012x + 0,2423$	0,9975
Endosulfan	$Y = 0,0618x - 0,2614$	0,9982
Cipermetrina	$Y = 0,0088x - 0,0542$	0,9984
Deltametrina	$Y = 0,0088x - 0,1013$	0,9956

Pode-se observar que o detector é mais sensível ao endosulfan, pois é o princípio ativo que apresenta um elevado coeficiente angular (a), seguido do clorpirifós, e dos piretróides. O endosulfan possui na sua molécula 6 átomos de cloro e assim têm maior afinidade por elétrons livres, causando uma maior diminuição da corrente elétrica e maior sinal na detecção. O clorpirifós apresenta em sua estrutura 3 átomos de cloro, os piretróides apresentam 2

átomos de cloro e 2 átomos de bromo para cipermetrina e deltametrina respectivamente, justificando a ordem de sensibilidade do detector.

Um coeficiente de correlação (r) maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 (ANVISA, 2003, RIBANI et al, 2004). Logo, observa-se que os valores de r obtidos são maiores que 0,99, indicando que existe uma resposta linear (uma relação direta sinal/concentração) do detector na faixa de 10,0 a 750,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os analitos estudados.

3.3. OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA (ESL-PBT).

Na otimização da metodologia ESL-PBT para alcatra e fígado bovino, alguns parâmetros foram avaliados individualmente e em seguida foi realizado um planejamento fatorial em que foram avaliadas três variáveis (tempo de agitação mecânica, força iônica, composição do solvente) e as interações entre elas.

Segundo RIBANI, 2004, os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120 %, com precisão de até ± 20 %. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120 %, com precisão de até ± 15 %. O objetivo desse trabalho foi otimizar todos os parâmetros de forma que a porcentagem de recuperação estivesse entre os intervalos aceitáveis de 70 e 120 %.

A investigação de algumas variáveis, tais como a massa de carne bovina (fixada em 3,0000 g) e tempo de contato foram necessárias para auxiliar na escolha de quais fatores e níveis seriam estudados no planejamento estatístico da ESL-PBT.

3.3.1. Avaliação da massa de carne bovina

Para estabelecer as condições ideais da ESL-PBT e análise dos agrotóxicos em carne bovina, foram feitos alguns testes preliminares no intuito de identificar as massas de alcatra e fígado bovino adequadas para o processo.

A principal vantagem de se utilizar quantidades maiores de amostra é que maiores quantidades do analito são extraídos em um mesmo volume de solvente. Entretanto, o uso de quantidades maiores de amostra pode provocar a contaminação do extrato pela extração de interferentes da matriz, além de dificultar a etapa de congelamento.

Os resultados obtidos após avaliação deste parâmetro para alcatra e fígado estão representados na Figura 3.3.a e Figura 3.3.b respectivamente.

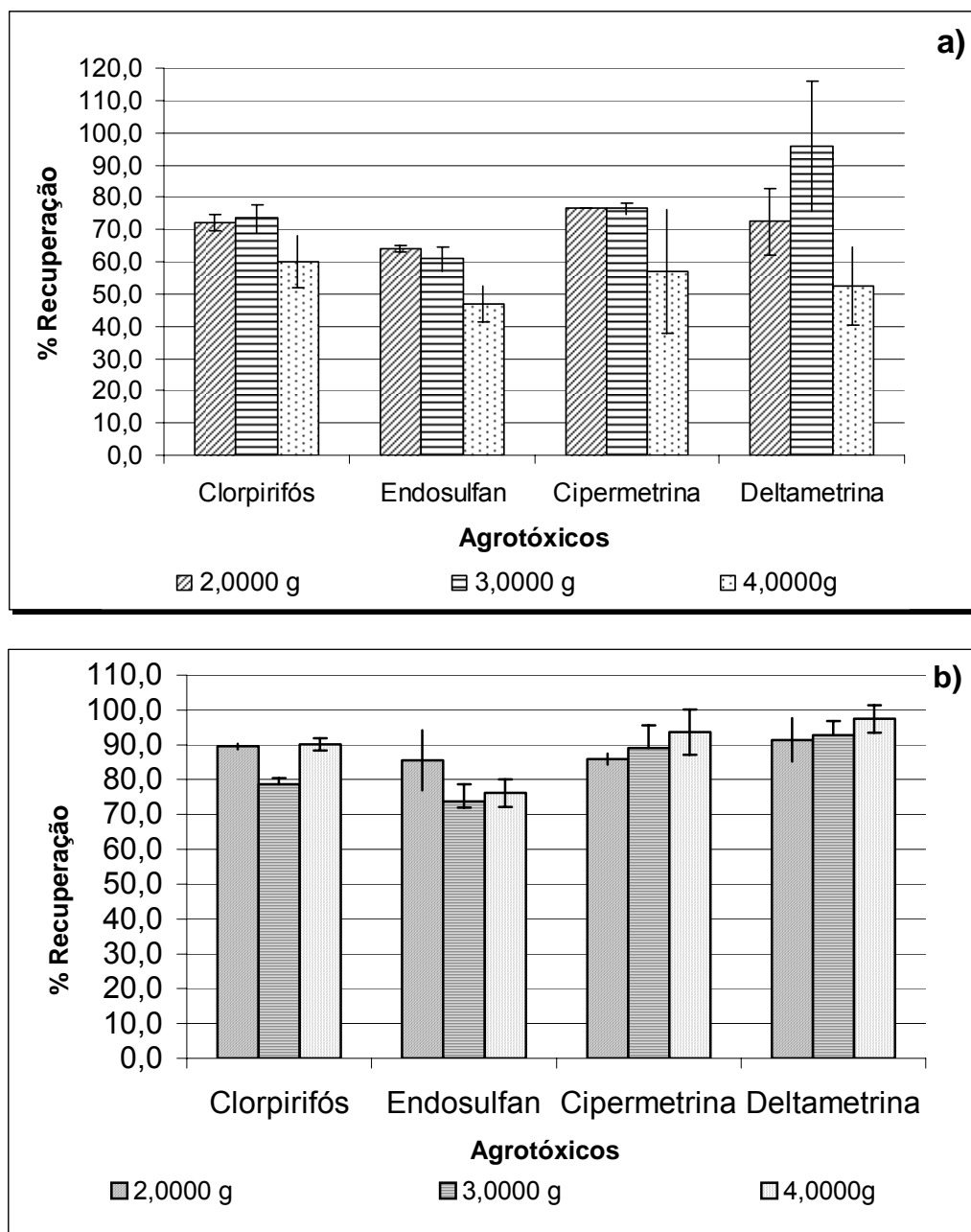


Figura 3.3. - Influência da massa na porcentagem de recuperação de quatro agrotóxicos de amostras de alcatra (a) e fígado (b)

Os resultados para todas as massas avaliadas foram semelhantes, devido ao elevado valor de desvio padrão obtido nos experimentos. Porém, observa-se para amostras de alcatra que a massa com melhor porcentagem de recuperação para os agrotóxicos clorpirifós, cipermetrina e deltametrina é a de 3,0000 g e para o endosulfan a de 2,0000 g. Para amostras de fígado, 4,0000 g foi a massa com maior porcentagem de recuperação para o clorpirifós, cipermetrina e deltametrina. Durante a condução dos experimentos, observou-se que a massa de 2,0000 g de carne bovina (alcatra e fígado) era pequena para ser trabalhada que os extratos obtidos a partir de 4,0000 g de amostras de fígado bovino apresentaram coloração amarelada mais intensa, possivelmente devido a extração de maiores quantidades de espécies coloridas (por exemplo a mioglobina) e outros componentes da matriz, diminuindo a repetitividade na determinação dos agrotóxicos analisados, sendo os extratos considerados inapropriados para análise cromatográfica.

Desta forma, decidiu-se trabalhar com a massa de 3,0000 gramas para ambas as amostras de carne.

3.3.2. Tempo de contato entre os agrotóxicos e as amostras de carne bovina.

Outra etapa inicial do processo de otimização da técnica consistiu em avaliar o tempo de contato entre os agrotóxicos e amostras antes de realizar a extração. Foi avaliado o efeito causado na porcentagem de recuperação dos agrotóxicos, quando os mesmos eram deixados em contato com as amostras de carne bovina, sem refrigeração, por diferentes intervalos de tempo.

O aumento do tempo de contato entre os agrotóxicos e a amostra, pode levar ao início do processo de degradação destes compostos antes de serem extraídos, ou permitem que estes se liguem mais fortemente à matriz sólida, diminuindo suas porcentagens de recuperação (PAULA, 2007). Porém, em se tratando de amostras *in natura*, observa-se que, quando essas amostras permanecem muito tempo sem refrigeração, ocorre a sua decomposição, alteração enzimática dos tecidos, podendo levar à degradação dos compostos.

Ao analisar amostras de alcatra e fígado bovino em diferentes tempos de fortificação, contados após sonicação por 3 minutos, foi possível observar que

no tempo de fortificação mínimo, extração imediatamente após sonicação por 3 minutos, até duas horas os valores de recuperação eram muito próximos. Porém, após período de 2 horas a análise cromatográfica era prejudicada, devido ao aumento da linha de base. Para preservação do sistema cromatográfico, amostra com tempo de fortificação superior a 2 horas não foram analisadas. Logo, para a realização do planejamento fatorial a faixa de tempo de contato entre os agrotóxicos e a carne escolhida, após sonicação por 3 minutos, foi de zero a duas horas.

3.4. PLANEJAMENTO FATORIAL NA OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ESL-PBT

Estudo realizado por Vieira (2005) demonstrou que a proporção água:acetonitrila (1:2) resultou em melhores porcentagens de extração de agrotóxicos na ESL-PBT. Com o objetivo de que a proporção água:solvente orgânico aproximasse da relação 1:2 e considerando que a massa de carne bovina (3,0000 g) contém aproximadamente 75 % de água, optou-se por acrescentar 1,0 mL de água e 6,5 mL de acetonitrila.

Na otimização avaliou-se a composição do solvente extrator, sendo uma utilizando somente acetonitrila (8,0 mL) e a outra com polaridade reduzida. Para reduzir a polaridade da acetonitrila optou-se por adicionar acetato de etila. Com essa combinação a extração dos agrotóxicos menos polares é favorecida. 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 máximo de 1,5 mL em 8,0 mL de fase extratora, para garantir uma fase homogênea.

Outro fator avaliado foi a força iônica, cujo o aumento é sempre recomendado na extração de pesticidas em amostras aquosas, pois a adição de um sal á 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 *salting-out*. Assim, para manter as características da mistura extratora (6,5 mL de acetonitrila, 1,0 mL de água e 1,5 mL 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.

Neste trabalho, para uma avaliação mais precisa da influência de cada variável e suas interações sobre a porcentagem de recuperação de cada agrotóxico, com um mínimo de experimentos, foi realizado um planejamento experimental do tipo fatorial completo 2³, no programa STATISTICA[®], no qual as variáveis independentes foram tempo de agitação, força iônica e composição do solvente e a variável dependente a porcentagem de recuperação. Devido a pequena diferença entre os níveis (+) e (-) das variáveis independentes, não foi realizada no planejamento a avaliação do ponto central, pois o aumento da força iônica ou do volume de acetato de etila adicionado na mistura extratora romperia o equilíbrio da fase única, separando as fases, diminuindo a superfície de contato entre os analitos e os solventes.

Na Tabela 3.2 e 3.3 estão apresentadas as taxas médias de recuperação de cada um dos agrotóxicos, o efeito de cada fator, suas interações e as estimativas do erro experimental para alcatra e fígado respectivamente. Para decidir se os efeitos calculados eram significativos, realizou-se o teste de t (*Student*) para $\alpha = 0,05$ e $\nu = 8$, ou seja, no nível de 95 % de confiança o valor de t correspondente a 8 graus de liberdade é 2,306. Isso quer dizer que só será considerado estatisticamente significativo, o efeito cujo valor de $t_{\text{calculado}}$ for maior que 2,306.

Tabela 3.2. - Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (\pm estimativa do erro experimental) na extração de cada um dos agrotóxicos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de alcatra bovina.

	Efeito (%)	σ (%)	t (n=8) (%)
Clorpirifós			
Recuperação média	79,11	0,77	102,82
(1) Tempo de agitação	0,06	1,54	0,04
(2) Força iônica	3,05	1,54	1,98
(3) Composição do solvente	3,36	1,54	2,18
(1) e (2)	0,90	1,54	0,58
(1) e (3)	-1,92	1,54	-1,25
(2) e (3)	-0,36	1,54	-0,23
Endosulfan			
Recuperação média	80,34	2,05	39,13
(1) Tempo de agitação	-10,59	4,11	-2,58
(2) Força iônica	-3,32	4,11	-0,81
(3) Composição do solvente	-2,71	4,11	-0,66
(1) e (2)	5,94	4,11	1,45
(1) e (3)	-0,58	4,11	-0,14
(2) e (3)	-4,37	4,11	-1,06
Cipermetrina			
Recuperação média	117,06	2,91	40,27
(1) Tempo de agitação	2,60	5,81	0,45
(2) Força iônica	0,33	5,81	0,06
(3) Composição do solvente	13,57	5,81	2,33
(1) e (2)	1,72	5,81	0,30
(1) e (3)	-7,61	5,81	-1,31
(2) e (3)	-0,50	5,81	-0,09

Deltametrina			
Recuperação média	87,38	4,33	20,19
(1) Tempo de agitação	1,42	8,65	0,16
(2) Força iônica	7,70	8,65	0,89
(3) Composição do solvente	15,57	8,65	1,80
(1) e (2)	1,36	8,65	0,16
(1) e (3)	12,85	8,65	1,48
(2) e (3)	3,09	8,65	0,36

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

Tabela 3.3. - Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (\pm estimativa do erro experimental) na extração de cada um dos agrotóxicos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de fígado bovino.

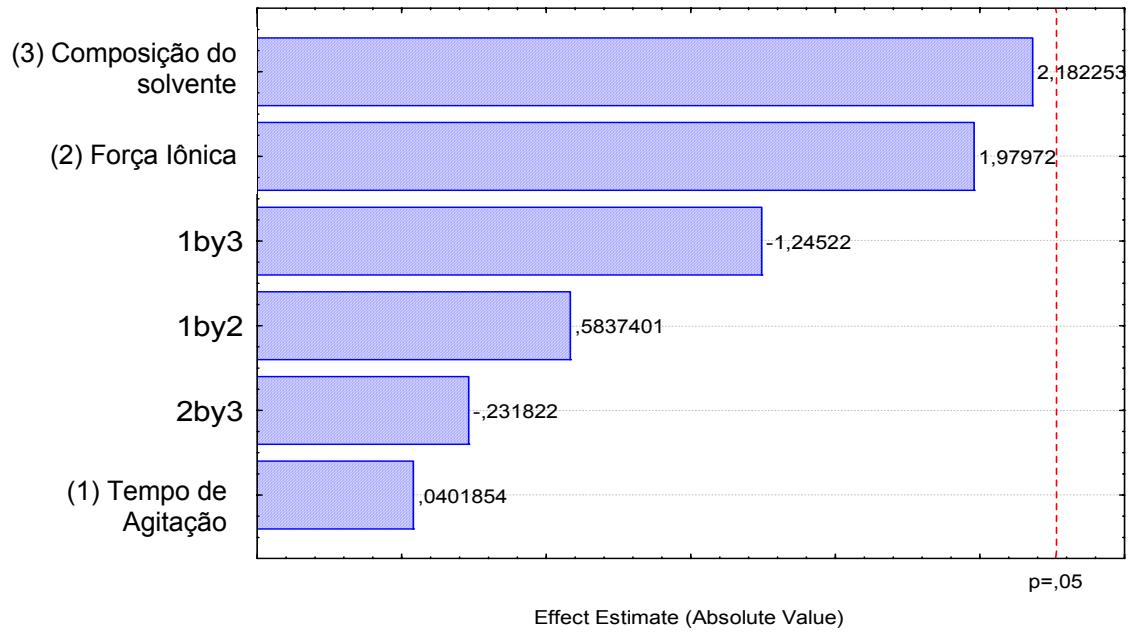
	Efeito (%)	σ (%)	t (n=8) (%)
Clorpirifós			
Recuperação média	87,27	1,35	64,69
(1) Tempo de agitação	1,09	2,70	0,40
(2) Força iônica	2,17	2,70	0,80
(3) Composição do solvente	2,01	2,70	0,75
(1) e (2)	-0,60	2,70	-0,22
(1) e (3)	-0,60	2,70	-0,22
(2) e (3)	-3,03	2,70	-1,12
Endosulfan			
Recuperação média	78,56	1,30	60,27
(1) Tempo de agitação	-0,65	2,61	-0,25
(2) Força iônica	3,33	2,61	1,28
(3) Composição do solvente	-1,97	2,61	-0,76
(1) e (2)	-1,61	2,61	-0,62
(1) e (3)	-2,94	2,61	-1,13
(2) e (3)	-1,74	2,61	-0,67

Cipermetrina			
Recuperação média	114,71	2,21	51,97
(1) Tempo de agitação	1,09	4,41	0,25
(2) Força iônica	-2,37	4,41	-0,54
(3) Composição do solvente	-1,90	4,41	-0,43
(1) e (2)	3,76	4,41	0,85
(1) e (3)	0,53	4,41	0,12
(2) e (3)	-0,33	4,41	-0,07
Deltametrina			
Recuperação média	119,37	2,48	48,19
(1) Tempo de agitação	-2,99	4,95	-0,60
(2) Força iônica	-6,36	4,95	-1,28
(3) Composição do solvente	-0,77	4,95	-0,16
(1) e (2)	-14,01	4,95	-2,83
(1) e (3)	-13,03	4,95	-2,63
(2) e (3)	-1,43	4,95	-0,29

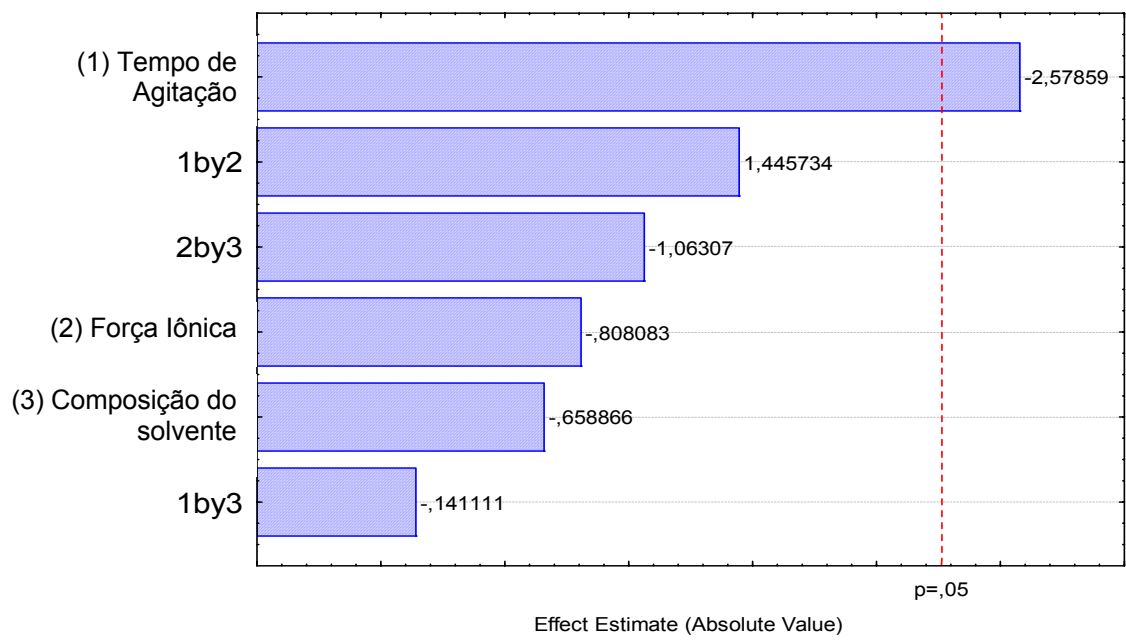
*(Em negrito) Efeito estatisticamente significativo ao nível de 95 % de probabilidade pelo teste t ($t_{\text{tab}} > t_{0,05; 8} = 2,306$).

Os resultados obtidos também podem ser fornecidos em forma de gráficos. O Gráfico de Pareto mostra os valores dos efeitos, possibilitando verificar se os mesmos são estatisticamente significativos.

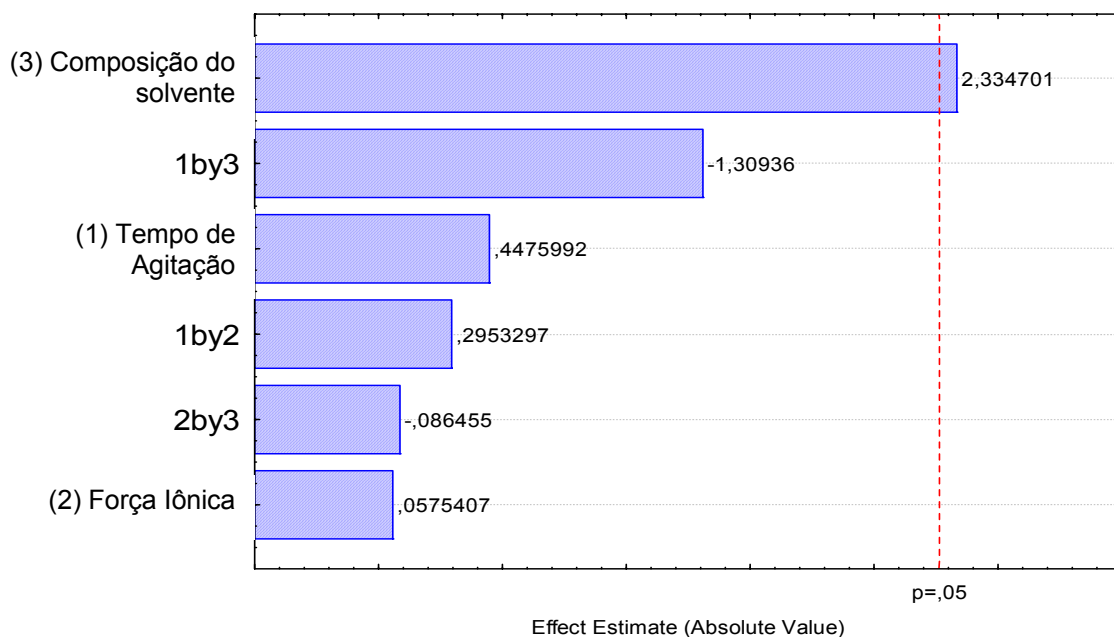
As Figuras 3.4.(a, b, c e d) e 3.5.(a, b, c e d) apresentam os Gráficos de Pareto obtidos nos planejamentos experimentais para alcatra e fígado bovino respectivamente para os agrotóxicos analisados, no qual o efeito é tão significativo na porcentagem de recuperação quanto mais à direita da linha vermelha ele estiver. Também são mostrados os efeitos das interações das variáveis duas a duas.



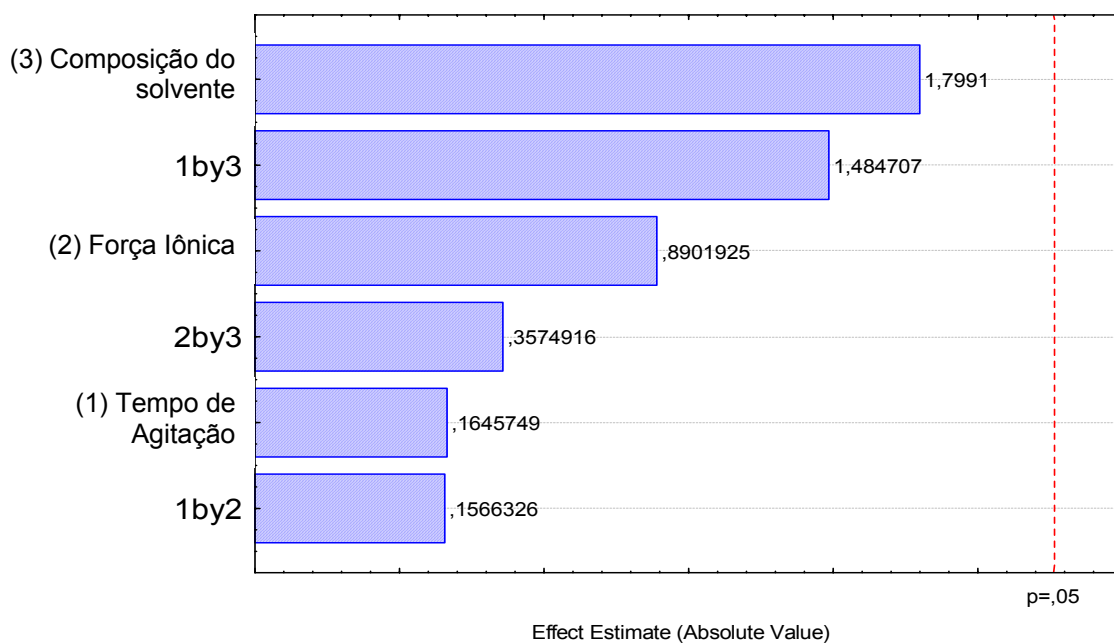
(a) Clorpirifós



(b) Endosulfan



(c) Cipermetrina



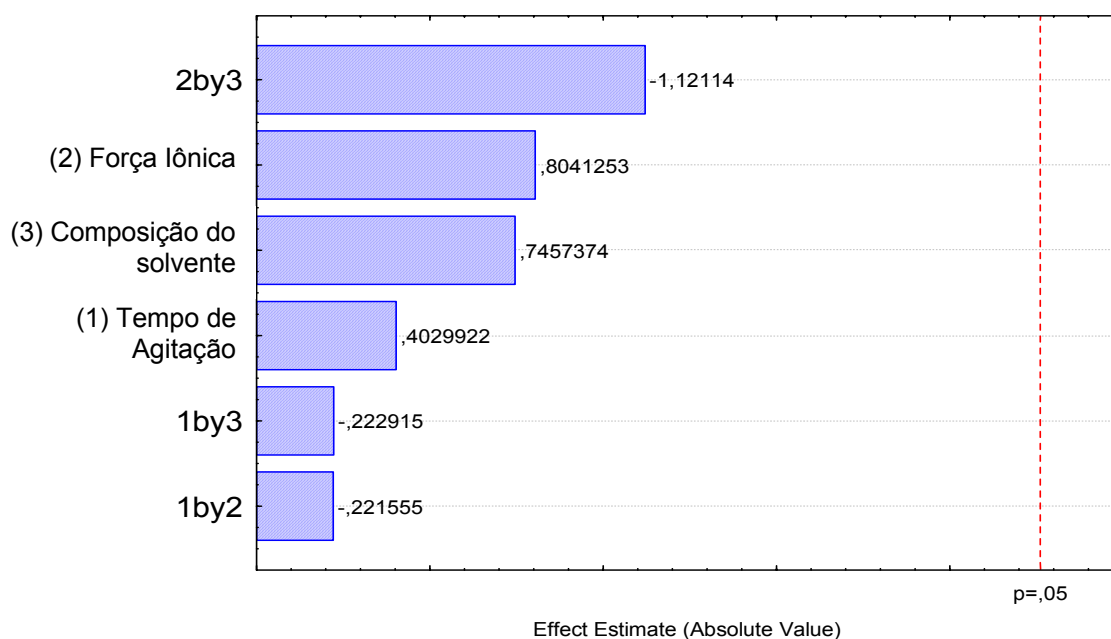
(d) Deltametrina

Figura 3.4 - Gráfico de Pareto - amostras de alcatra

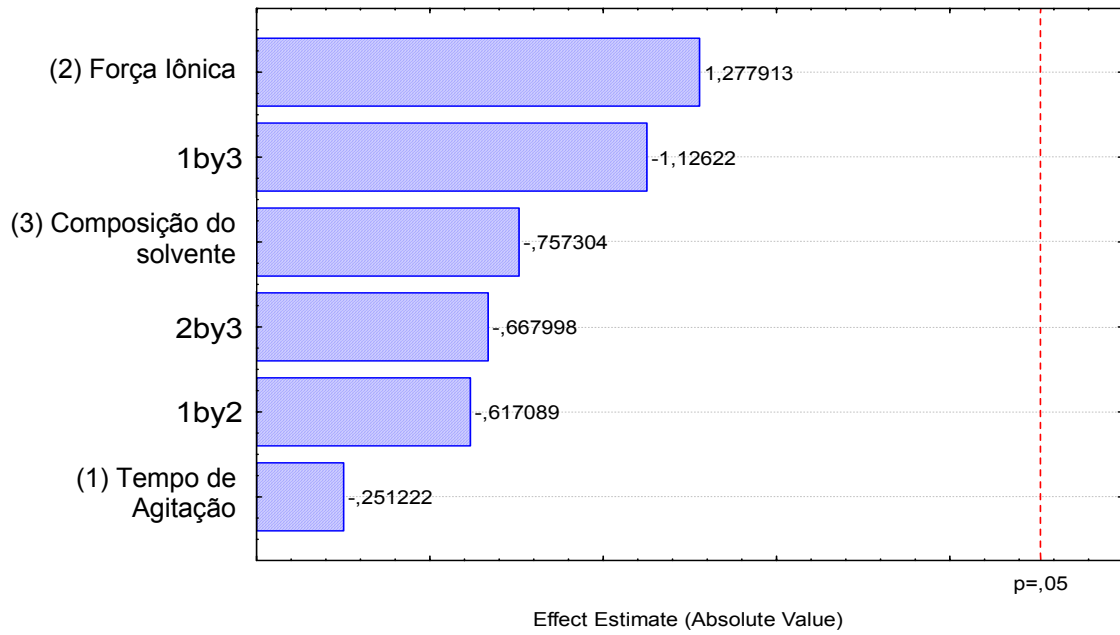
Segundo os gráficos 3.4 (a, b, c e d) e a tabela 3.2, para amostras de alcatra, somente o endosulfan e a cipermetrina apresentam efeitos significativos. O tempo de agitação é a variável que mais interfere na porcentagem de recuperação para o endosulfan e isso ocorre de forma inversa

(valor negativo do coeficiente), ou seja, o aumento do tempo de agitação de 30 para 45 minutos diminui a porcentagem de recuperação. Para a cipermetrina a composição do solvente aumenta o rendimento quando se trabalha com o nível (+) (6,5 mL de acetonitrila e 1,5 mL de acetato de etila). Logo, para determinar as condições ótimas da ESL-PBT, foram consideradas as variáveis significativas de forma que se tivesse o aumento na porcentagem de recuperação para todos os analitos estudados. Observou-se que a presença de força iônica não foi significativa para nenhum dos agrotóxicos estudados, desta forma, decidiu-se trabalhar sem força iônica para tornar a metodologia mais simples.

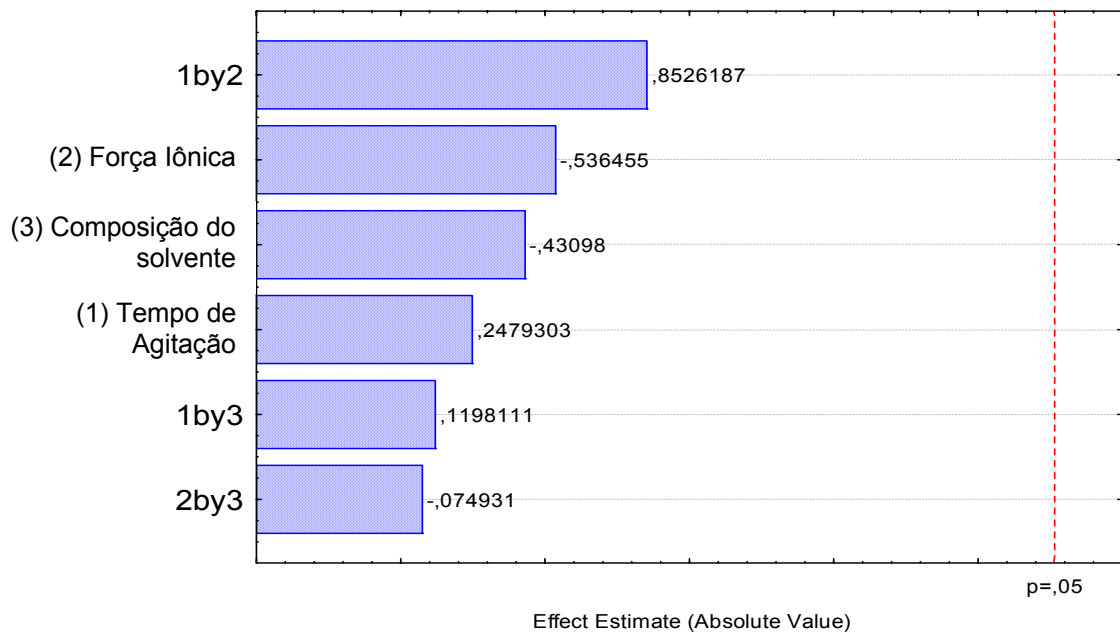
As condições que apresentaram maior rendimento para todos os agrotóxicos em amostras de alcatra foram, composição do solvente (6,5 mL de acetonitrila + 1,5 mL de acetato de etila), 30 minutos de agitação mecânica e ausência de força iônica.



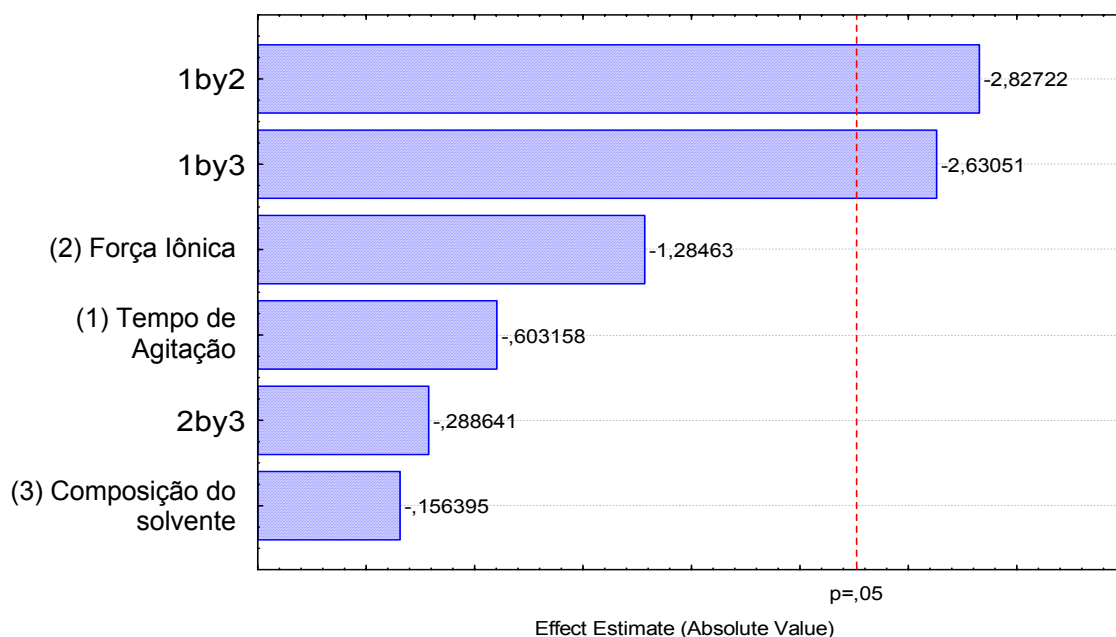
(a) Clorpirifós



(b) Endosulfan



(c) Cipermetrina



(d) Deltametrina

Figura 3.5 - Gráfico de Pareto - amostras de fígado

Para as amostras de fígado, é possível observar pelos gráficos 3.5 (a, b, c e d) e a tabela 3.3, que somente a deltametrina apresenta efeitos significativos. As interações das variáveis, tempo de agitação com a força iônica e tempo de agitação com a composição do solvente extrator, são as que mais interferem na porcentagem de recuperação para a deltametrina. O efeito das interações apresentou valores de coeficiente negativo (-14,00 e -13,03 respectivamente). Desta, foram utilizadas como condições otimizadas pelo planejamento, os níveis (-) para todas as variáveis independentes.

As condições que apresentaram maior rendimento para todos os agrotóxicos em amostras de fígado foram, composição do solvente (8,0 mL de acetonitrila), 30 minutos de agitação mecânica e ausência de força iônica.

3.5. EFEITO DA AGITAÇÃO MECÂNICA E SONICAÇÃO NA EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO DOS AGROTÓXICOS EM CARNE BOVINA

Para realizar a otimização da técnica de ESL-PBT, os efeitos do tempo de agitação mecânica e do ultra-som na eficiência da extração de carne bovina (alcatra e fígado) contaminada com os agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina foram avaliados. Para uma extração eficiente dos

agrotóxicos, é necessário que o solvente extrator tenha contato efetivo com as moléculas dos princípios ativos. A agitação mecânica tem sido empregada para auxiliar a extração de moléculas orgânicas de sólidos. Entretanto, o banho ultra-sônico vem, nos últimos anos, assumindo também esta função (SANTOS & CAPELO, 2007).

Neste trabalho, avaliou-se a agitação mecânica e a agitação por ultra-som dos frascos contendo carne bovina fortificada e solvente extrator. As amostras foram submetidas a por tempos de 5, 10 e 15 minutos e comparados a agitação mecânica de 30 minutos. Os valores encontrados estão apresentados nas Figuras 3.6 e 3.7 para alcatra e fígado, respectivamente.

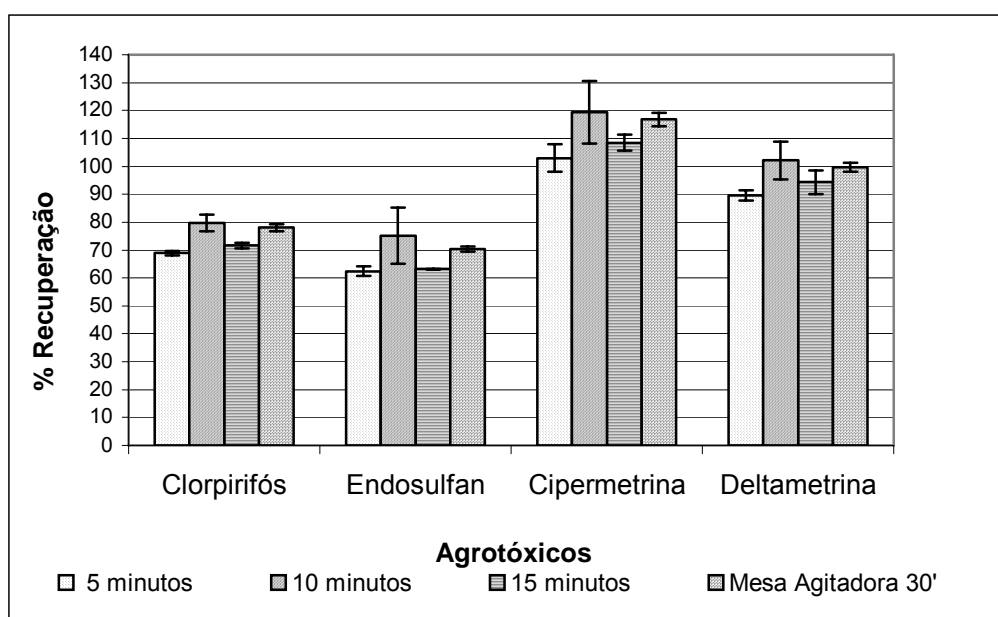


Figura 3.6. - Efeito da agitação mecânica e diferentes tempos de agitação por ultra-som na porcentagem de recuperação do clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina para amostras de alcatra.

Observa-se para amostras de alcatra que não houve grande diferença nos rendimentos de extração em função do tipo e do tempo de agitação. Entretanto, o tempo de 10 minutos em agitação por ultra-som aumentou a porcentagem de recuperação para todos os analitos estudados. Sendo assim, 10 minutos de ultra-som foi escolhido na etapa de agitação da ESL-PBT. Porcentagens de recuperação superiores a 100 % foram obtidas para os piretróides, o tempo de contato entre a amostra e o solvente extrator pode ter levado à maior extração de componentes da matriz que interferiram na quantificação desses princípios ativos que são largamente afetados pelo efeito

de matriz.

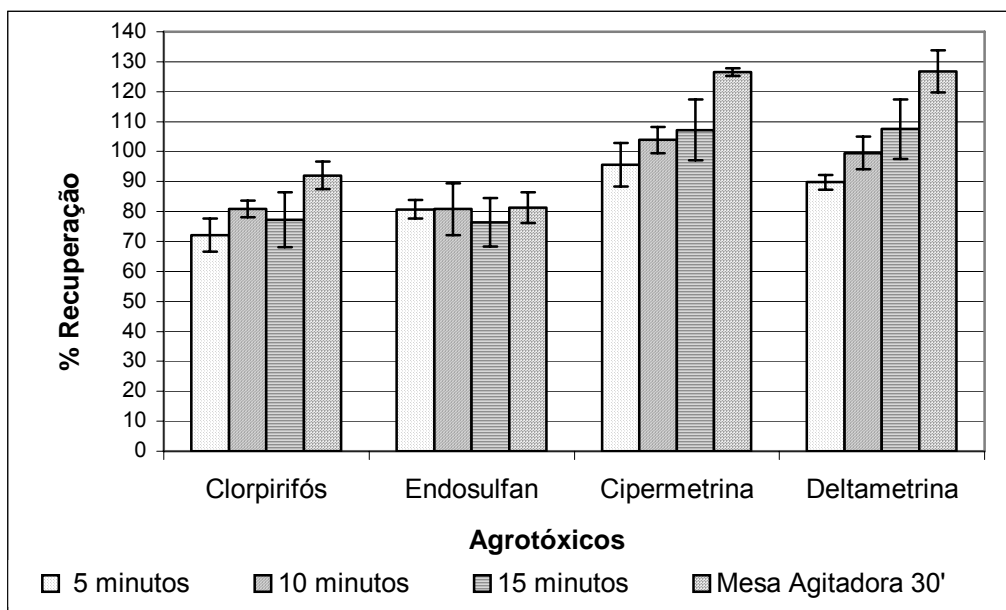


Figura 3.7. - Efeito da agitação mecânica e diferentes tempos de agitação por ultra-som na porcentagem de recuperação do clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina para amostras de fígado.

Para amostras de fígado bovino, 30 minutos de agitação em mesa agitadora apresentou melhor porcentagem de recuperação para todos os princípios ativos. Observa-se também que recuperações maiores que 120 % foram obtidas para os agrotóxicos cipermetrina e deltametrina nessas condições, devido a co-extração de componentes da matriz, interferindo na quantificação desses princípios ativos. O endosulfan apresentou porcentagem de recuperação semelhante independente do tipo e tempo de agitação. Analisando as porcentagens de recuperação obtidas pela agitação por ultra-som, observou-se que o tempo de 10 minutos apresenta melhores resultados para o clorpirifós e endosulfan e próximos a 100 % para a cipermetrina e deltametrina, sendo, portanto o tempo de agitação selecionado para as análises de fígado bovino.

3.6. EFICIÊNCIA DE ADSORVENTES NO *CLEAN UP* DOS EXTRATOS OBTIDOS NA ESL-PBT DE AMOSTRAS DE CARNE BOVINA

Resultados satisfatórios foram obtidos na otimização da ESL-PBT para as amostras de carne bovina, porém, devido à presença de pigmentos nos

extratos obtidos a partir de amostras de fígado, tornou-se necessário avaliar o *clean up* desses extratos com o objetivo de diminuir a presença de pigmentos e componentes da matriz que possam danificar o sistema cromatográfico. No entanto, conforme ressaltado por Schenck & Lehotay (2000), a etapa de *clean up* pode resultar na perda parcial dos agrotóxicos além de aumentar o tempo e o custo das análises.

Foram avaliados os adsorventes florissil e sílica na etapa de filtração do extrato após o congelamento e a adição de carvão ativado na mistura da amostra com a fase extratora, antes do processo de homogeneização. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 3.8 e 3.9.

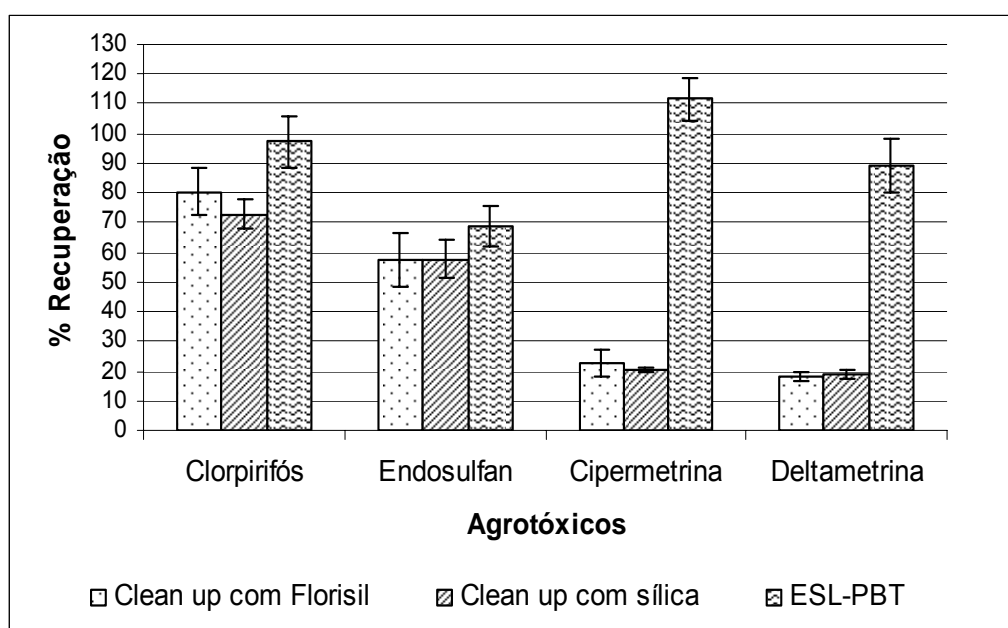


Figura 3.8. - Influência dos adsorventes, sílica e florissil, na porcentagem de recuperação do clorpirifós, endosulfan, deltametrina e cipermetrina de extratos de fígado.

Comparando os extratos obtidos pela ESL-PBT com e sem presença de adsorventes verificou-se que a sílica e o florissil não eliminaram os pigmentos do extrato, isto é, a etapa de *clean up* introduzida no procedimento não “proporcionou” extratos mais claros. Além disso, a inclusão desta etapa, resultou na diminuição da taxa de recuperação dos quatro agrotóxicos estudados, devido à adsorção destes nos adsorventes. A perda foi mais acentuada para os piretróides, chegando a 86,6 % para cipermetrina quando utilizado sílica e 66,5 % para deltametrina quando utilizado florissil como adsorvente (Figura 3.8).

A adição de pequenas quantidades de carvão ativado durante o processo de extração se mostrou mais eficiente na remoção dos componentes da matriz, observado pela redução parcial na coloração do extrato e menor perda dos agrotóxicos pela adsorção destes no carvão ativado do que a sílica e o florissil. A Figura 3.9 mostra a influência da adição de diferentes quantidades de carvão, durante a extração, na porcentagem de recuperação dos agrotóxicos. Observou-se que à medida que a quantidade de carvão ativado foi aumentada nos extratos, maior a remoção dos pigmentos, mas as porcentagens de recuperação dos analitos diminuíram, com exceção do endosulfan cuja extração foi pouco afetada pela presença do carvão ativado durante a homogeneização. Porém, devido à redução das taxas de recuperação para valores abaixo de 70 % para os demais agrotóxicos, a etapa de *clean up* utilizando carvão ativado ou outro adsorvente não foi recomendada.

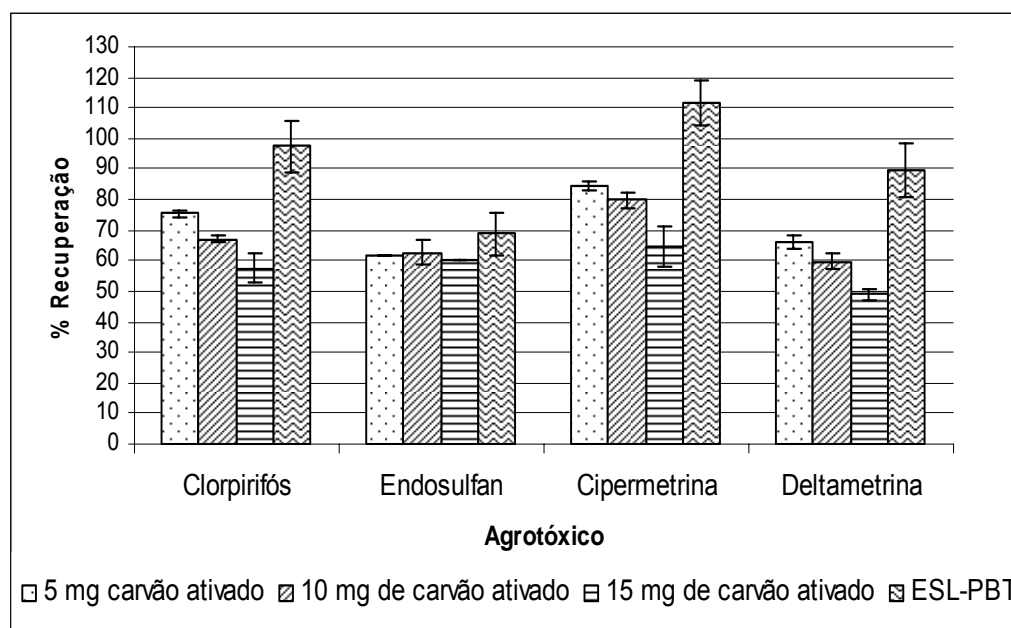


Figura 3.9. - Influência de diferentes quantidades de carvão ativado, na porcentagem de recuperação do clorpirifós, endosulfan, deltametrina e cipermetrina em amostras de fígado.

A remoção dos pigmentos observada nos extratos submetidos à etapa de *clean up* foi acompanhada por espectrometria na região UV-visível. Avaliando o espectro de adsorção na região 250 a 780 nm (Figura 3.10) para os extratos de fígado, isentos de agrotóxicos, obtidos de diferentes técnicas de extração e diferentes adsorventes, a ESL-PBT com etapa de *clean up*

utilizando florisil é o que apresenta menor quantidade de pigmentos e assim, menor quantidade de componentes da matriz, seguido da ESL-PBT com *clean up* utilizando sílica e a ESL-PBT, comportamento esse observado pela menor absorvância em 330 nm (região UV) e 450 nm (banda de solet, comprimento de onda característica de hemoproteínas). Porém, como observado na Figura 3.8, a utilização de adsorventes diminui a porcentagem de recuperação dos agrotóxicos, além de aumentar o custo e o tempo de análise, tornando não conveniente a etapa de *clean up*.

A aplicação de outra técnica, como DMFS, extrai mais pigmentos e componentes da matriz, tornando seus extratos mais coloridos e com maior quantidade de componentes da matriz, como observado na Figura 3.10 pelo aumento da absorvância.

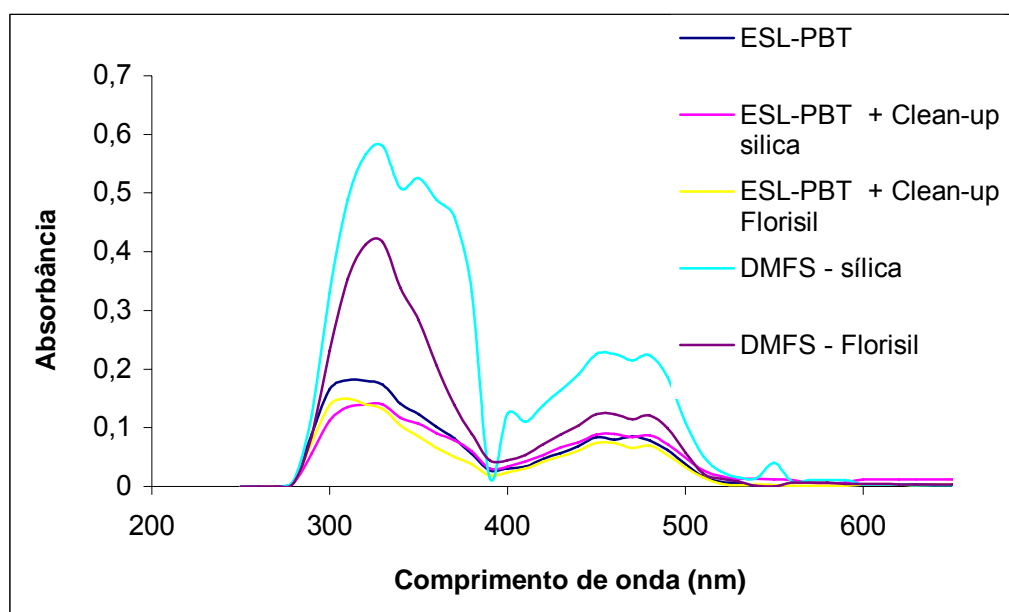


Figura 3.10. - Espectros de absorção dos extratos no UV-visível ($\lambda = 250$ a 780 nm), obtidos a partir de diferentes técnicas de extração e seus adsorventes para extratos de fígado.

Em função dos resultados obtidos, decidiu-se trabalhar com a ESL-PBT sem etapa de *clean up*, devido ao pouco ganho na remoção de pigmentos e componentes da matriz e perda dos agrotóxicos estudados.

3.7. MÉTODO OTIMIZADO DA ESL-PBT E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA DE QUATRO AGROTÓXICOS EM CARNE BOVINA

Propõe-se como metodologia otimizada extrair 3,0000 g de carne bovina (alcatra e fígado), previamente homogeneizadas, com 1,0 mL de água, 6,5 mL de acetonitrila e 1,5 mL de acetato de etila, para alcatra e 1,0 mL de água, 8,0 mL de acetonitrila para fígado. Agitar a mistura em ultra-som por 10 minutos e posteriormente deixar em freezer a aproximadamente -20 °C por 12 horas. Após o congelamento filtrar as amostras sob gravidade, na presença de sulfato de sódio anidro. Recuperados os extratos em balão volumétrico de 10,0 mL e armazenar em freezer até o momento da análise cromatográfica.

A metodologia otimizada apresentou resultados satisfatórios para as matrizes estudadas, apresentando extratos limpos sem necessidade de adicionar etapas de *clean up* nem etapa de concentração, além de pequeno consumo de solvente e por ser uma técnica relativamente rápida e simples

3.8. DISPERSÃO DE MATRIZ EM FASE SÓLIDA – DMFS

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

Trabalhos realizados com amostras de carne mostram que não existe uma técnica considerada de referência e a maioria das técnicas utilizadas consome muito solvente, tempo, sendo necessário ainda etapas de *clean up* para essas matrizes devido a sua complexidade. As técnicas mais empregadas são ESL seguido ou não de ELL, EFS e etapa *clean up* com cromatografia por permeação em gel entre outras (RONNING et al, 2006; COSTABEBER et al, 2006; GARRIDO-FRENICH et al, 2006; JUHLER, 1997; SALLAM & MOSHEDY, 2008; SEO et al, 2005; PATEL et al, 2005)

A DMFS é uma técnica que realiza extração e *clean up* dos extratos simultaneamente (KRISTENSON et al, 2006), e tem sido aplicada em amostras sólidas e semi-sólidas, como por exemplo, tecidos de animais e em vários vegetais. Kishida (2007) utilizou DMFS em amostras de carne para determinação de sulfonamidas por cromatografia líquida, utilizando como

adsorvente a alumina e como solvente extrator o etanol.

Com o objetivo de comparar a ESL-PBT otimizada com a DMFS, as metodologias foram aplicadas a amostras de alcatra e fígado. Antes de empregar a DMFS foi necessário avaliar o adsorvente e o solvente adequado para extração dos princípios ativos utilizando a DMFS em amostras de carne bovina. Neste estudo, foram avaliados os adsorventes sílica e florisil, utilizando a proporção amostra:adsorvente igual a 1:1, e os eluentes acetonitrila, acetato de etila e a mistura hexano:acetona (9:1).

Para as amostras de fígado, independente do adsorvente utilizado, a DMFS não se mostrou seletiva, ou seja, os extratos obtidos após aplicação da técnica apresentaram picos referentes aos componentes da matriz coincidentes com os picos dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina, tornando, nessas condições, impossível determinar e quantificar os analitos estudados.

Para amostras de alcatra, o método se mostrou seletivo, sendo possível determinar e quantificar os analitos e assim avaliar as condições (adsorvente e solvente) ideais para determinação dos agrotóxicos estudados utilizando a DMFS. Inicialmente, avaliou-se o florisil com os eluentes acetonitrila, acetato de etila e a mistura hexano:acetona e os resultados são apresentados na Figura 3.11. Não é observada grande diferença nos rendimentos de extração em função do eluente utilizado. A mistura hexano:acetona apresentou maior porcentagem de recuperação para clorpirifós, endosulfan e deltametrina e porcentagem de recuperação próxima a 70 % para cipermetrina sendo o eluente escolhido para extração com florisil.

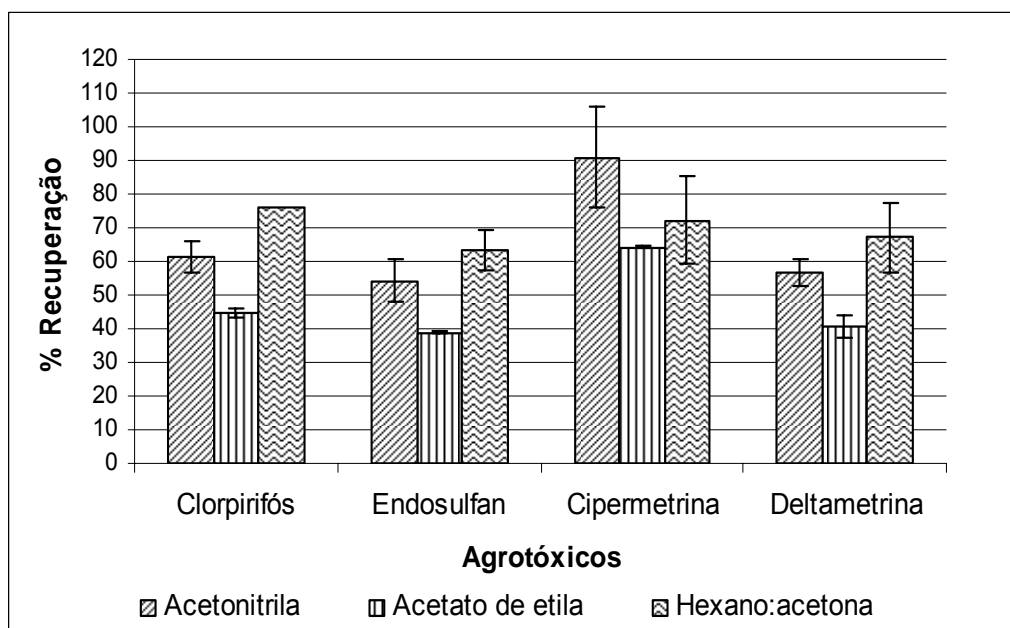


Figura 3.11. - Influência de diferentes solventes na porcentagem de recuperação do clorpirifós, endosulfan, deltametrina e cipermetrina para a DMFS utilizando florisil em amostras de alcatra.

Para sílica (Figura 3.11), entre os eluentes acetonitrila, acetato de etila e a mistura hexano:acetona, escolheu-se também a mistura hexano:acetona por apresentar maior porcentagem de recuperação para todos os princípios ativos.

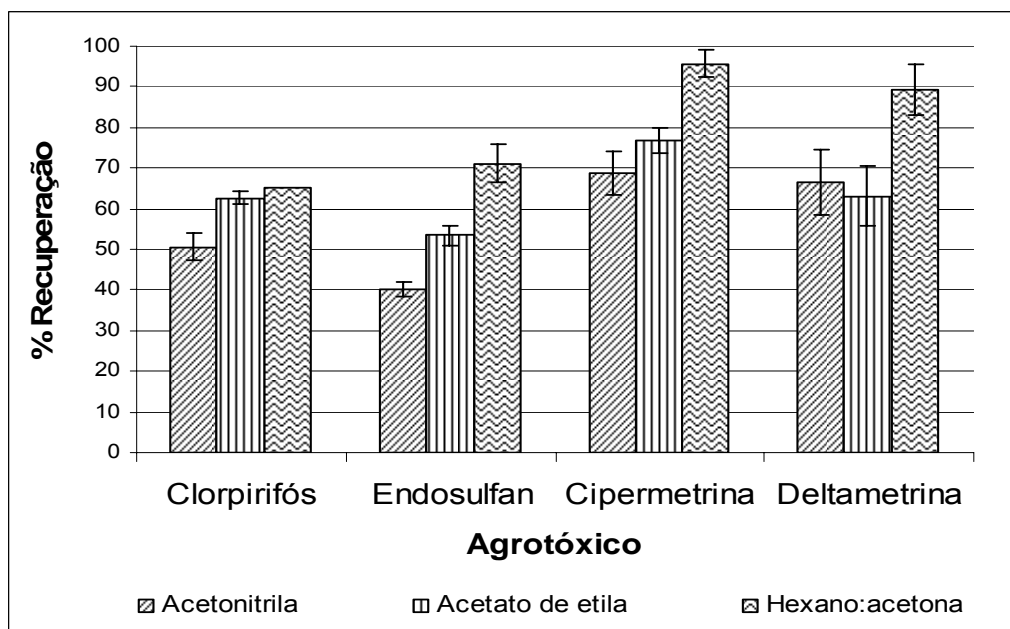


Figura 3.12. - Influência de diferentes solventes na porcentagem de recuperação do clorpirifós, endosulfan, deltametrina e cipermetrina para a DMFS utilizando sílica.

Comparando os adsorventes sílica e florisil (Figura 3.13), ambos utilizando a mistura hexano:acetona como eluente, a sílica apresentou melhor porcentagem de recuperação para endosulfan, cipermetrina e deltametrina sendo essa diferença acentuada para os piretróides. Para o clorpirifós, o florisil foi o adsorvente mais adequado, com recuperação superior a 70 %. Porém, faz-se necessário avaliar outras variáveis, como por exemplo, diferentes proporções amostras:adsorventes, etapas de *clean up* utilizando co-coluna, homogeneização da mistura amostra, adsorvente e eluente por ultra-som, entre outras, de forma a melhorar a porcentagem de recuperação e a qualidade dos extratos.

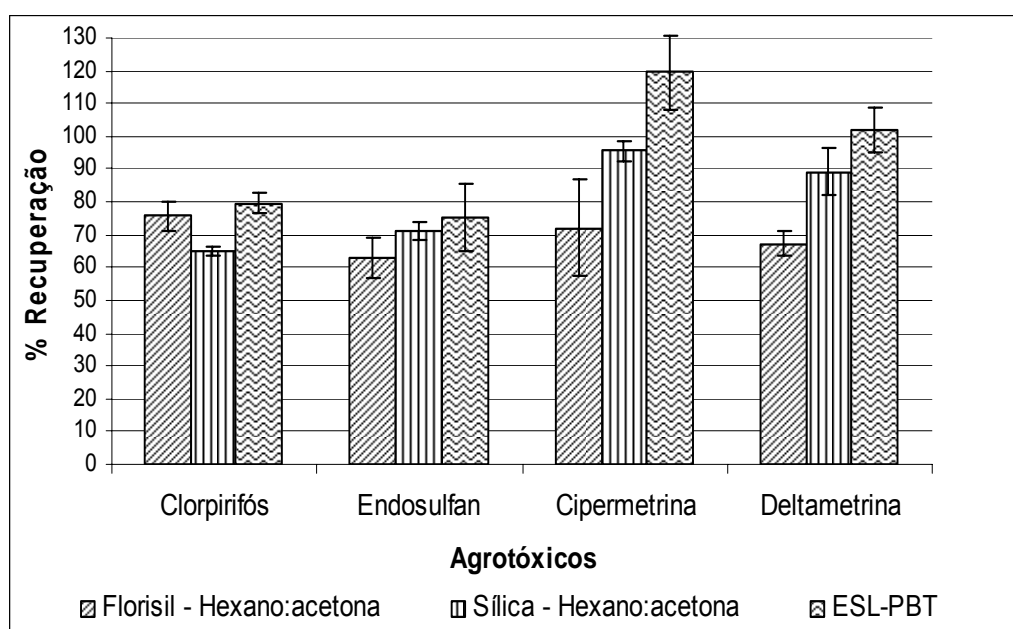


Figura 3.13. - Influência de diferentes adsorventes e eluentes na porcentagem de recuperação do clorpirifós, endosulfan, deltametrina e cipermetrina para a DMFS e comparação com a ESL-PBT.

Observa-se para amostras de alcatra que não houve grande diferença nos porcentagens de recuperação quando empregadas as técnicas DMFS e ESL-PBT e ambas se mostraram equivalentes quando comparados os cromatogramas qualitativamente. Porém a ESL-PBT se mostrou mais eficiente na recuperação de todos os princípios ativos e tem como vantagem o menor número de etapas, não precisa concentrar os extratos e baixo consumo de solvente. A DMFS utilizando sílica/hexano:acetona como adsorvente e eluente, possui como vantagens o menor tempo no preparo de amostra e utiliza

pequena quantidade de amostra (Figura 3.13), mas é mais susceptível à presença de interferentes nos extratos, proveniente dos adsorventes, componentes da matriz em relação a ESL-PBT, maior custo devido a utilização de adsorventes não recuperáveis ao final do experimento e é necessário que os adsorvente sejam previamente condicionados, o que aumenta consideravelmente o consumo de solventes.

Portanto, a técnica ESL-PBT é uma alternativa de extração dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina em amostras de carne bovina, proporcionando resultados qualitativos e quantitativos mais satisfatórios, quando comparado com a DMFS.

3.9. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

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

3.9.1. Seletividade

Este parâmetro foi avaliado utilizando a ESL-PBT dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina em alcatra e fígado bovino, comparando-se os cromatogramas de extratos da matriz isenta dos agrotóxicos com extratos da matriz fortificados com os compostos.

Na Figura 3.14 e 3.15, estão mostradas as comparações dos cromatogramas para alcatra e fígado respectivamente.

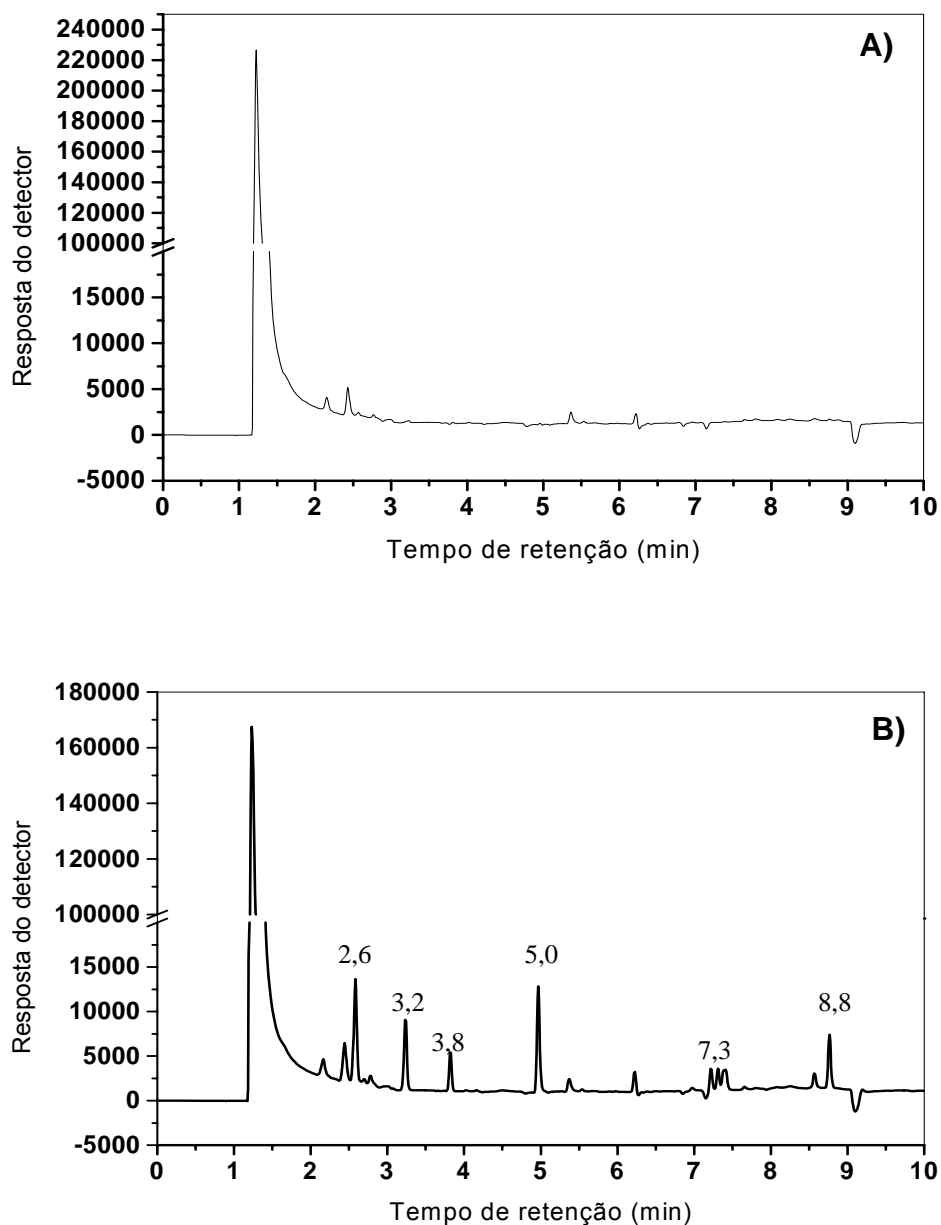


Figura 3.14. - (A) Cromatograma do extrato obtido da matriz de alcatra isenta dos princípios ativos estudados e (B) cromatograma da amostra fortificada com $50,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ dos princípios ativos estudados, onde: $t_R = 2,6$: clorpirifós, $t_R = 3,2$: α -endosulfan, $t_R = 3,3$: β -endosulfan, $t_R = 5,0$: bifentrina (PI), $t_R = 7,3$: cipermetrina, $t_R = 8,8$: deltametrina

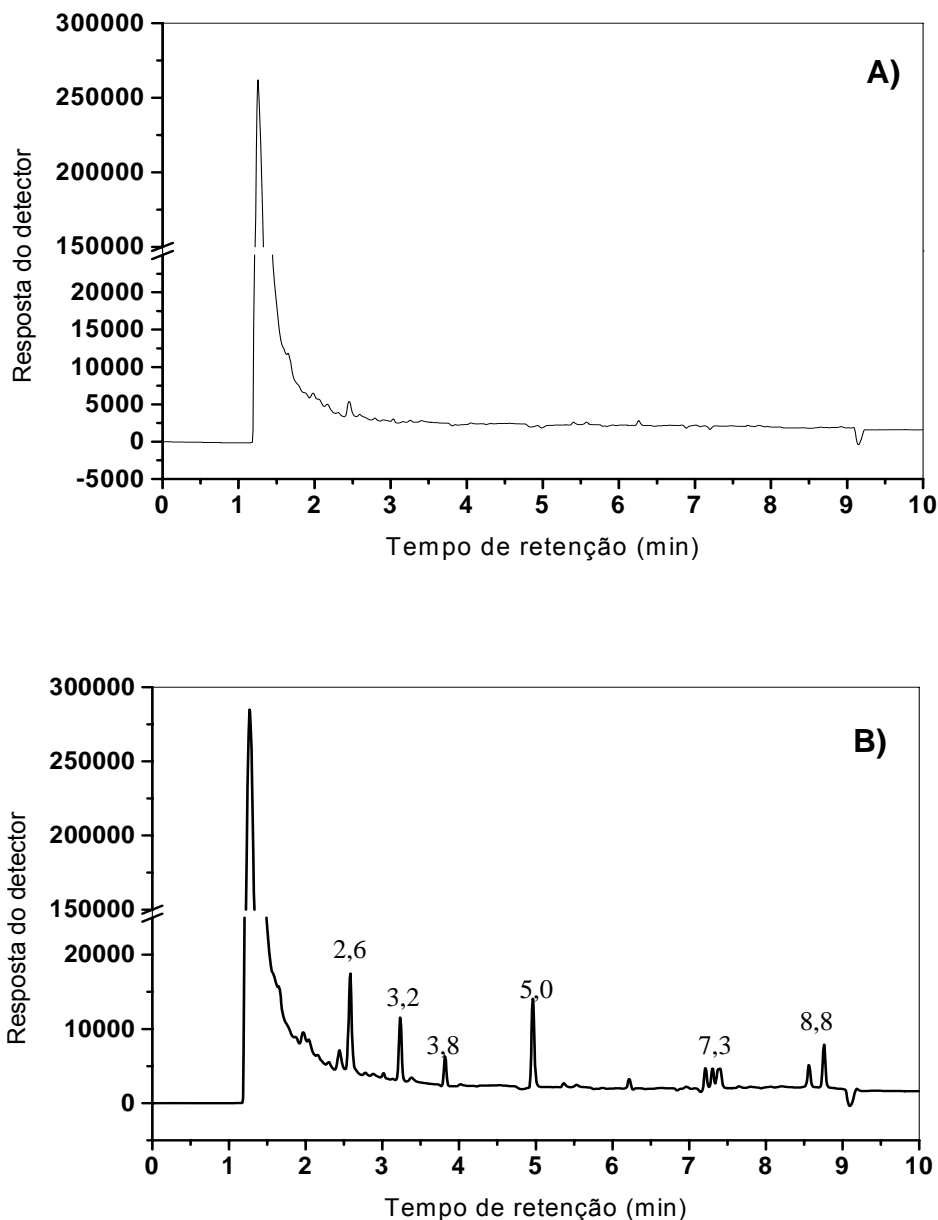


Figura 3.15. - (A) Cromatograma do extrato obtido da matriz de fígado isenta dos princípios ativos estudados e (B) cromatograma da amostra fortificada com $50,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ dos princípios ativos estudados, onde: $t_R = 2,6$: clorpirifós, $t_R = 3,2$: α -endosulfan, $t_R = 3,3$: β -endosulfan, $t_R = 5,0$: bifentrina (PI), $t_R = 7,3$: cipermetrina, $t_R = 8,8$: deltametrina

Os extratos das amostras de alcatra e fígado bovino, apesar de possuírem uma composição complexa, não apresentaram interferentes nos mesmos tempos de retenção dos compostos analisados o que torna a metodologia seletiva. A seletividade do detector (ECD) também contribuiu para obtenção desses resultados. Além disso, os picos referentes aos princípios

ativos e padrão interno apresentam boa separação, simetria adequada e, portanto uma ótima seletividade.

3.9.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) para métodos cromatográficos corresponde à menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como valor exato. O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração da substância de interesse que pode ser quantificada com exatidão (INMETRO, 2003).

Os limites de detecção e quantificação foram determinados pelo método da relação sinal-ruído, em que o LD encontrado foi referente à concentração que proporcionou um sinal três vezes maior que o ruído médio do aparelho e o LQ um sinal dez vezes maior que esse ruído. Esse método é visual, onde as concentrações detectáveis e quantificáveis das substâncias de interesse são determinadas visualmente, considerando-se a quantidade de composto capaz de produzir um sinal analítico três e dez vezes maior que o nível do ruído de fundo (COLLINS et al, 1997).

Os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* para os analitos deltametrina e cipermetrina quando utilizados como drogas veterinárias apresentam valores menores quando comparados aos mesmos quando utilizados como agrotóxicos, sendo os valores utilizados em amostras de alcatra, 50,0 e 30,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e fígado 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para cipermetrina e deltametrina. O endosulfan e o clorpirifós apresentam limites mais elevados porque esses compostos e seus metabólitos apresentam baixa persistência e bioacumulação (KAN & MEIJER, 2007) e a transferência da alimentação para o tecido é baixa, sendo seus limites 0,2 e 1,0 mg kg^{-1} para clorpirifós e 0,1 e 0,01 mg kg^{-1} em amostras de alcatra e fígado respectivamente.

Levando-se em conta os LMR acima, a massa da amostra utilizada no método em desenvolvimento (3,0000 g), o volume de extrato adquirido (10,0 mL) e as porcentagens de recuperação de cada composto, tem-se que as concentrações mínimas a serem detectadas pelo CG-DCE nos extratos de

alcatra e fígado são aproximadamente 3,0, 2,85, 5,0 e 3,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e as concentrações mínimas a serem quantificadas são 10,0, 15,0, 9,75 e 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para deltametrina, cipermetrina, endosulfan e clorpirifós respectivamente. Os valores de LQ estão abaixo do LMR exigido para o clorpirifós em carne bovina e endosulfan nas duas matrizes e possui valores próximos para clorpirifós em fígado e para cipermetrina e deltametrina nas matrizes avaliada.

3.9.3. Linearidade da metodologia otimizada

A linearidade é a capacidade de um método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma faixa de aplicação (RIBANI et al, 2004).

Inicialmente foi determinada a linearidade da resposta do detector para concentrações de 10,0 a 750,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, obtendo coeficientes de correlação de 0,9975; 0,9982; 0,9984 e 0,9956 para o clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina respectivamente. Sendo, estes resultados foram apresentados no item 3.2.

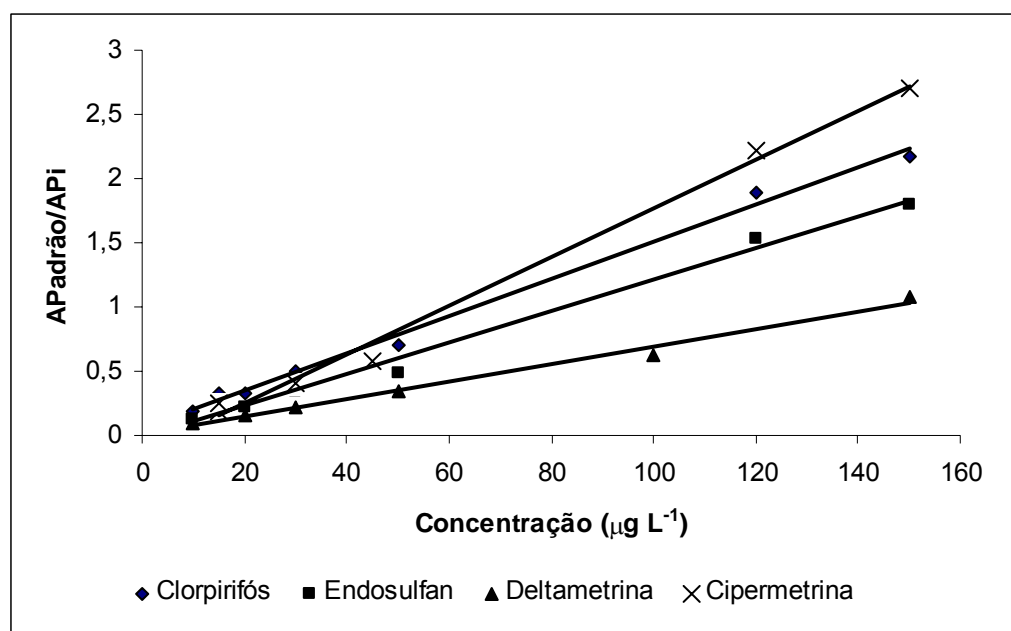


Figura 3.16. - Curvas analíticas dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina obtidos da aplicação da técnica ESL-PBT em amostras de alcatra.

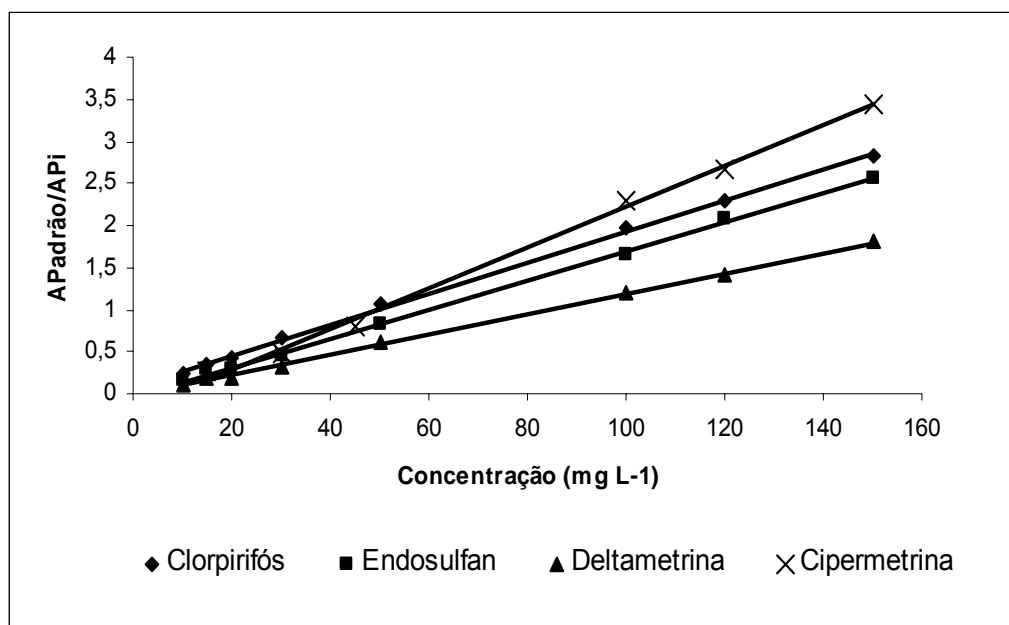


Figura 3.17. - Curvas analíticas dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina obtidos da aplicação da técnica ESL-PBT em amostras de fígado.

As equações da reta e os dados de correlação são apresentados na Tabela 3.4. Os coeficientes de correlação encontrados são maiores que 0,99 caracterizando um ajuste ideal dos dados para a regressão linear de acordo com a ANVISA (2003) e o INMETRO (2003).

Tabela 3.4. - Equações das retas e coeficientes de correlação obtidos para os agrotóxicos.

Matriz	Agrotóxicos	Equação	r
Alcatra	Clorpirifós	$y = 0,0145x + 0,0556$	0,997
	Endosulfan	$y = 0,0123x - 0,0175$	0,996
	Cipermetrina	$y = 0,0188x - 0,1571$	0,991
	Deltametrina	$y = 0,0067x + 0,0258$	0,993
Fígado	Clorpirifós	$y = 0,0185x + 0,0871$	0,999
	Endosulfan	$y = 0,0173x - 0,0276$	0,999
	Cipermetrina	$y = 0,0242x - 0,1964$	0,998
	Deltametrina	$y = 0,0121x - 0,0226$	0,999

A faixa de concentrações foi escolhida de forma que o último ponto da curva fosse 10 e 15 vezes o limite de quantificação obtido para cipermetrina e deltametrina, respectivamente, e a faixa de concentração fosse coerente com

os LMRs dos piretróides, porém, para o endosulfan e o clorpirifós, como os LMRs são maiores que os LQ, considerou-se para essa escolha somente os LQs. Assim, a metodologia aplicada para amostras de alcatra e fígado bovino apresenta linearidade de resposta na faixa de concentração de 10,0 a 150,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, para os compostos estudados. Com a utilização do método de padronização interna foi possível obter melhores resultados em comparação com a padronização externa. Pequenas variações de injeção ou no equipamento, como volume de amostra injetado, fluxo do gás de arraste e temperatura da coluna, foram minimizados.

3.9.4. Precisão

A precisão é um termo geral utilizado para avaliar a dispersão de resultados obtidos para uma mesma amostra (LANÇAS, 2004). Ela foi considerada em dois níveis: repetitividade e precisão intermediária

3.9.4.1. Repetitividade

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas por um mesmo método sob as mesmas condições de medição. Ela pode ser expressa quantitativamente em termos da característica de dispersão dos resultados determinada pelo desvio padrão de sete repetições ou mais (INMETRO, 2003).

Tabela 3.5 - Porcentagens de recuperação (% R), desvio padrão (DP) e coeficientes de variação (CV) obtidos após sete extrações de agrotóxicos em amostras de alcatra e fígado.

Matriz	Agrotóxicos	% R	DP	CV (%)
Alcatra	Clorpirifós	79,52	8,04	10,12
	Endosulfan	76,69	4,74	6,17
	Cipermetrina	91,10	11,27	12,37
	Deltametrina	82,24	5,96	7,24
Fígado	Clorpirifós	74,86	4,59	6,13
	Endosulfan	71,63	6,68	9,32
	Cipermetrina	84,49	7,71	9,13
	Deltametrina	80,37	4,49	5,59

Os resultados do coeficiente de variação (CV) obtidos para as amostras de alcatra variam entre 6,17 e 12,37 % e para o fígado bovino entre 5,59 e 9,32 % (Tabela 3.5). Entretanto, esses valores demonstram repetitividade, uma vez que os coeficientes de variação se encontram abaixo do recomendado para amostras complexas. Segundo Ribani et al (2004), são aceitáveis CV de até 20 % para amostras complexas. Um fato relevante é que as sete extrações foram realizadas em amostras fortificadas próximo ao Limite de Quantificação ($15 \mu\text{g L}^{-1}$), região que apresenta maior desvio na resposta cromatográfica.

3.9.4.2. Precisão intermediária

Este parâmetro analítico refere-se às variações ocorridas dentro de um mesmo laboratório quando um ou mais fatores importantes são modificados, como diferentes analistas, diferentes dias ou diferentes equipamentos (RIBANI et al, 2004). A precisão intermediária do método foi verificada pelas porcentagens de recuperação dos analitos e respectivos coeficientes de variação (CV) analisados em três dias diferentes. As análises foram realizadas no 1º, 7º e 30º dia, pelo mesmo analista, mesmo equipamento, etc. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Porcentagens de extração e coeficientes de variação (CV) obtidos após análise em diferentes dias, pelo mesmo analista.

Matriz	Agrotóxicos	Primeiro dia	Sétimo dia	Trigésimo dia	CV (%)
		% R	% R	% R	
Alcatra	Clorpirifós	76,7 ± 3,8	79,5 ± 10,1	80,9 ± 3,5	2,75
	Endosulfan	69,0 ± 4,7	76,69 ± 6,2	80,8 ± 10,7	7,93
	Cipermetrina	106,1 ± 5,7	91,1 ± 12,4	103,8 ± 4,2	8,05
	Deltametrina	75,7 ± 5,3	82,2 ± 7,2	99,5 ± 5,4	14,34
Fígado	Clorpirifós	97,4 ± 8,7	78,2 ± 3,9	79,6 ± 3,7	12,58
	Endosulfan	76,4 ± 6,8	70,6 ± 7,8	75,2 ± 13,4	4,13
	Cipermetrina	111,6 ± 7,5	133,6 ± 6,1	119,4 ± 9,4	9,18
	Deltametrina	89,3 ± 8,8	80,4 ± 5,6	102,1 ± 6,5	12,04

Observa-se (Tabela 3.6) que os valores do coeficiente de variação encontrados para os agrotóxicos em amostras de alcatra e fígado são menores que 20,0 %, indicando que o método ESL-PBT apresenta boa precisão intermediária.

3.9.5. Exatidão

Existem vários processos para avaliar a exatidão de um método, como o emprego dos materiais de referência, a comparação de métodos, e os ensaios de recuperação. Neste trabalho, foi realizado o ensaio de recuperação, o qual se baseia na eficiência de recuperação (% R) que é definido como a proporção da quantidade de substância de interesse, previamente adicionada à matriz, que é extraída e passível de ser analisada (INMETRO, 2003). A exatidão de um método representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2003).

Na avaliação deste parâmetro analítico, foi realizado um ensaio de recuperação em que os extratos obtidos apresentavam concentração de 10,0, 20,0, 50,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para clorpirifós, endosulfan e deltametrina, e 15,0, 30,0, 75,0 e 150,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cipermetrina, que são aproximadamente 1, 2, 5 e

10 vezes o limite de quantificação. A porcentagem de recuperação (R) e o coeficiente de variação são indicados na tabela 3.7.

Tabela 3.7 - Avaliação da exatidão do método de ESL-PBT, para os ensaios de recuperação e coeficiente de variação.

Matriz	Agrotóxicos	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$							
		10,0* e 15,0**		20,0 e 30,0**		50,0* e 75,0**		100,0* e 150,0**	
		% R	CV	% R	CV	% R	CV	% R	CV
Alcatra	Clorpirifós	86,9	11,8	78,1	11,6	85,6	2,1	93,7	8,4
	Endosulfan	78,6	6,9	69,6	3,7	73,7	6,1	98,5	6,5
	Deltametrina	126,3	4,5	107,8	5,6	123,5	11,7	147,5	6,3
	Cipermetrina	82,4	2,5	70,2	10,4	89,7	8,5	109,1	8,1
Fígado	Clorpirifós	79,5	3,0	71,3	7,1	88,2	1,8	78,2	3,9
	Endosulfan	59,0	11,7	52,7	7,4	66,8	2,0	70,6	7,8
	Deltametrina	106,2	3,7	113,1	9,7	143,14	2,1	133,6	6,1
	Cipermetrina	70,3	2,0	67,6	2,7	80,6	1,7	79,6	5,9

Concentrações adotadas para *clorpirifós, endosulfan e deltametrina e para **cipermetrina.

Os intervalos de recuperação e os coeficientes de variação encontrados são aceitáveis, levando em consideração que valores de recuperação entre 70 e 120 %, com coeficiente de variação de até 20 % e, ainda, dependendo da complexidade da amostra de 50 a 120 % com variação de 15 % (AGARP, 1999).

3.10. EFEITO DE MATRIZ NO MÉTODO MULTIRRESÍDUO

A avaliação do efeito de matriz na análise dos compostos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina em carnes bovinas empregando método ESL-PBT, foi realizada de acordo com o procedimento descrito no item 2.3.6.

Para avaliar o efeito de matriz, as curvas analíticas preparadas em acetonitrila e em extrato de matriz foram comparadas para o clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina. As Figuras 3.18 (a, b, c e d) e 3.19 (a, b, c e d) apresentam os resultados obtidos para alcatra e fígado bovino

respectivamente.

Pela Figura 3.18 (a, b, c e d), é possível observar que há maior diferença dos valores dos coeficientes angulares das curvas construídas em solvente puro e em extrato de alcatra para os princípios ativos cipermetrina (c) e endosulfan (b) evidenciando o efeito de matriz na resposta cromatográfica. Há também diferenças nas curvas do clorpirifós e da deltametrina, porém menos acentuadas, indicando que a presença dos componentes da matriz interfere menos na resposta do detector para esses compostos.

Observa-se que a resposta (área padrão/área do padrão interno) encontrada para endosulfan em uma dada concentração é menor em extrato da matriz quando comparado ao padrão preparado em acetonitrila. Para o clorpirifós, cipermetrina e deltametrina, a resposta obtida em uma dada concentração em acetonitrila apresenta uma resposta menor quando comparados aos mesmos preparados em extrato de matriz. Isso sugere que componentes da matriz presentes na amostras podem bloquear os sítios ativos no injetor e desse modo prevenir ou estimular a possível degradação e adsorção de analitos nessa câmara de vaporização, levando a diminuição (endosulfan) ou aumento (piretróides e clorpirifós) da resposta dos analitos quando presentes nos extratos da amostra.

Resultados e comportamentos semelhantes foram obtidos para o fígado, como mostrado na Figura 3.19 (a, b, c e d), sendo observado efeito de matriz mais acentuado para a cipermetrina, deltametrina e endosulfan e menos acentuado para o clorpirifós.

Estudos realizados no LAQUA para o clorpirifós e para os piretróides em diferentes matrizes, como tomate e batata (PINHO, 2007; DARDENGO, 2007) mostraram resultados semelhantes aos obtidos para carne bovina. Sánchez-Brunete et al (2005) observaram que compostos menos polares, com maior ponto de ebulição e maior massa molar, como os piretróides, tiveram suas respostas cromatográficas aumentadas quando extratos dos brancos das matrizes foram fortificadas com padrões e analisados.

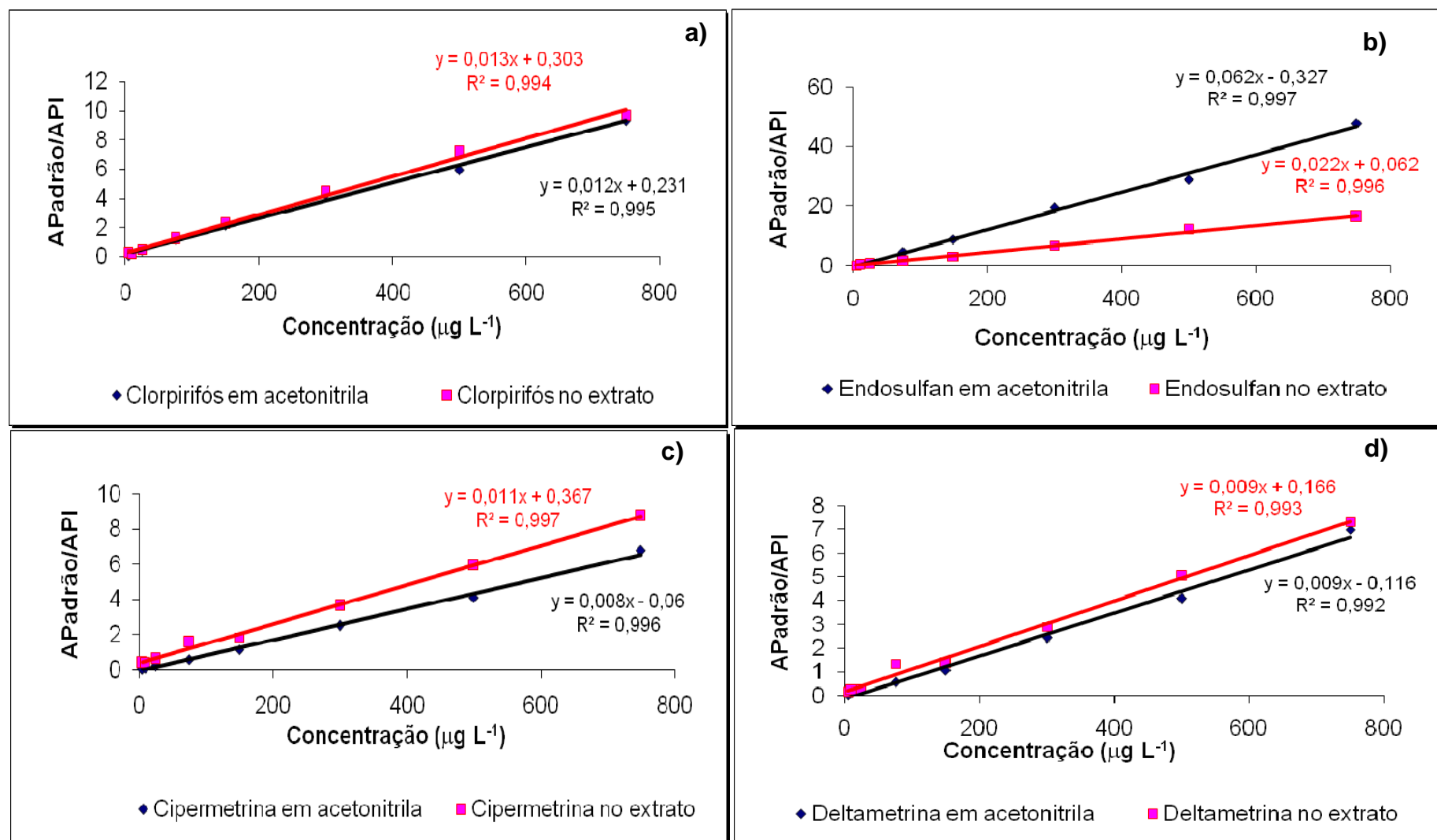


Figura 3.18 – Curvas analíticas dos princípios ativos (a) clorpirifós, (b) endosulfan, (c) cipermetrina e (d) deltametrina em acetonitrila e em extratos de alcatra bovina.

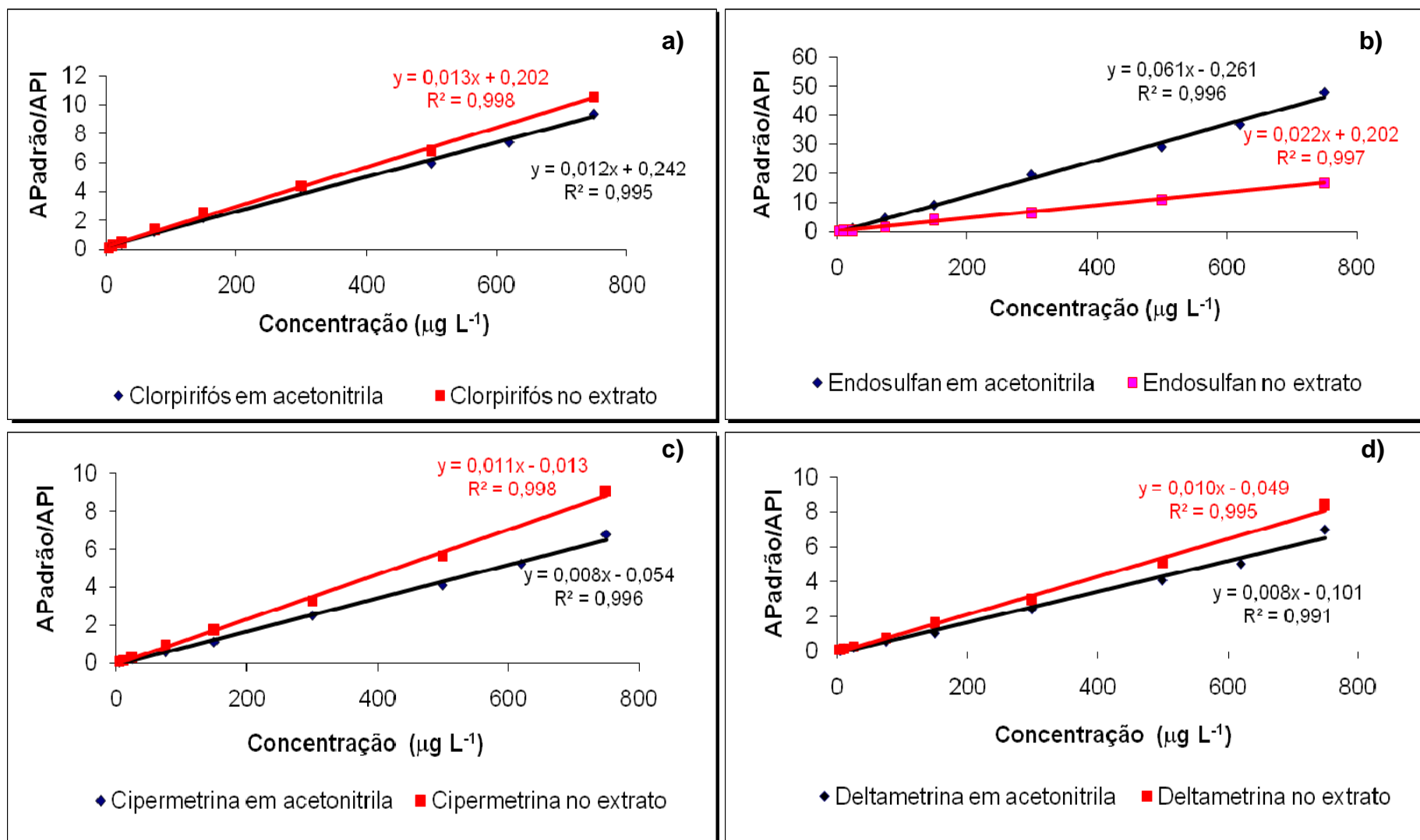


Figura 3.19 – Curvas analíticas dos princípios ativos (a) clorpirifós, (b) endosulfan, (c) cipermetrina e (d) deltametrina em acetonitrila e em extrato de fígado bovino.

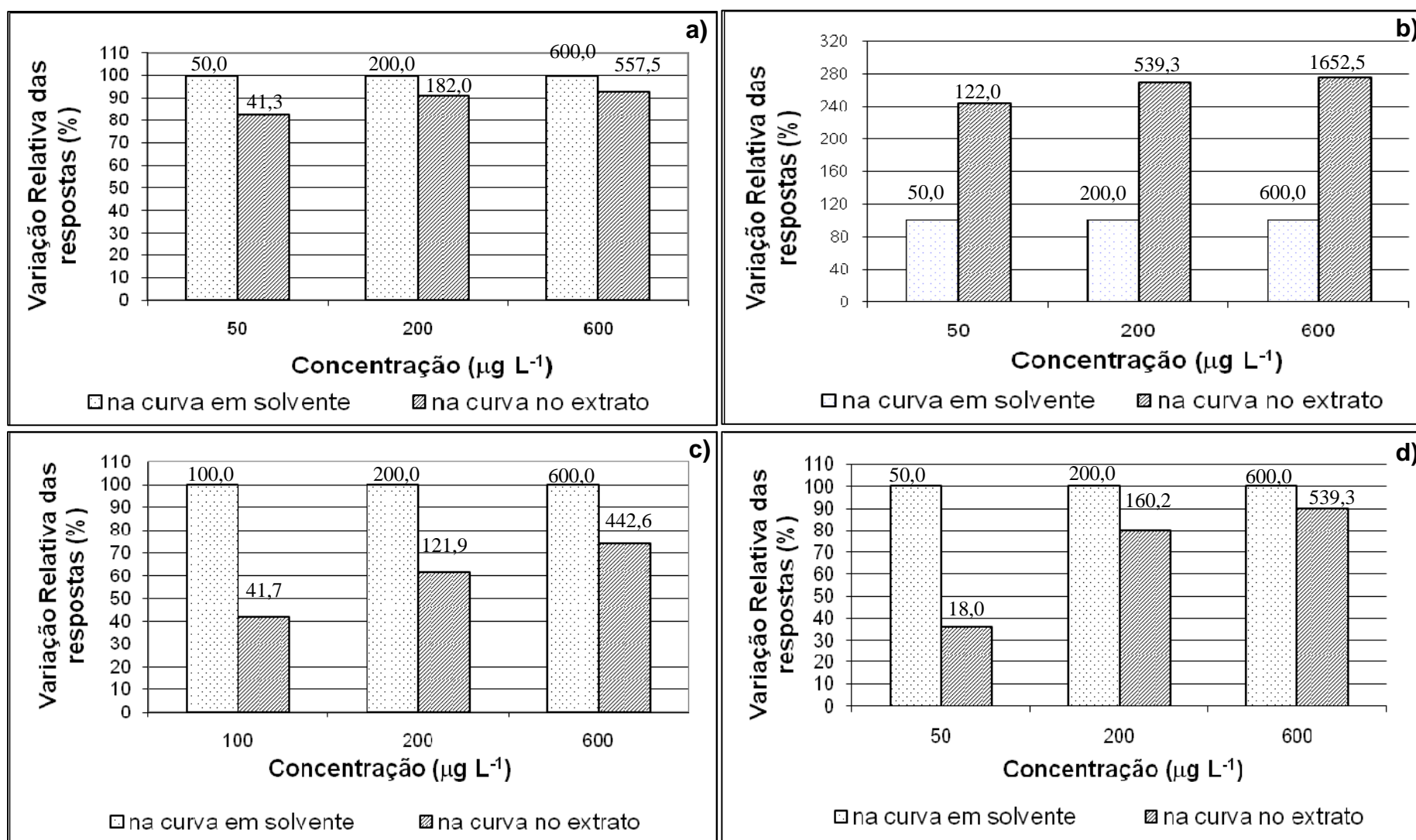


Figura 3.20 – Variação relativa das respostas (Área do analito/Área do padrão interno) calculadas para os princípios ativos (a) clorpirifós, (b) endosulfan, (c) cipermetrina e (d) deltametrina quando utilizada a curva analítica em solvente (100%) e no extrato de alcatra.

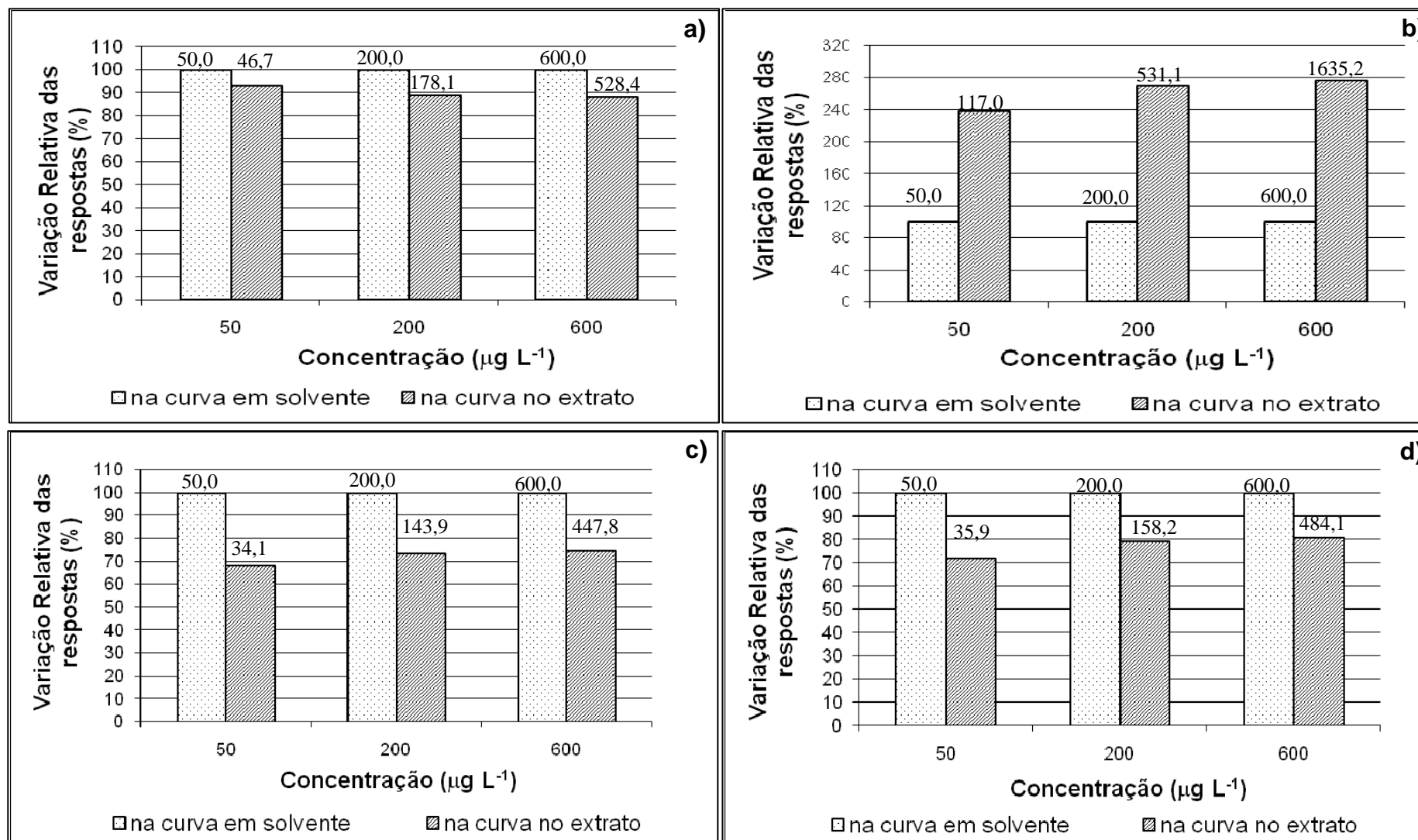


Figura 3.21 – Variação relativa das respostas (Área do analito/Área do padrão interno) calculadas para os princípios ativos (a) clorpirifós, (b) endossulfan, (c) cipermetrina e (d) deltametrina quando utilizada a curva analítica em solvente (100%) e no extrato de fígado.

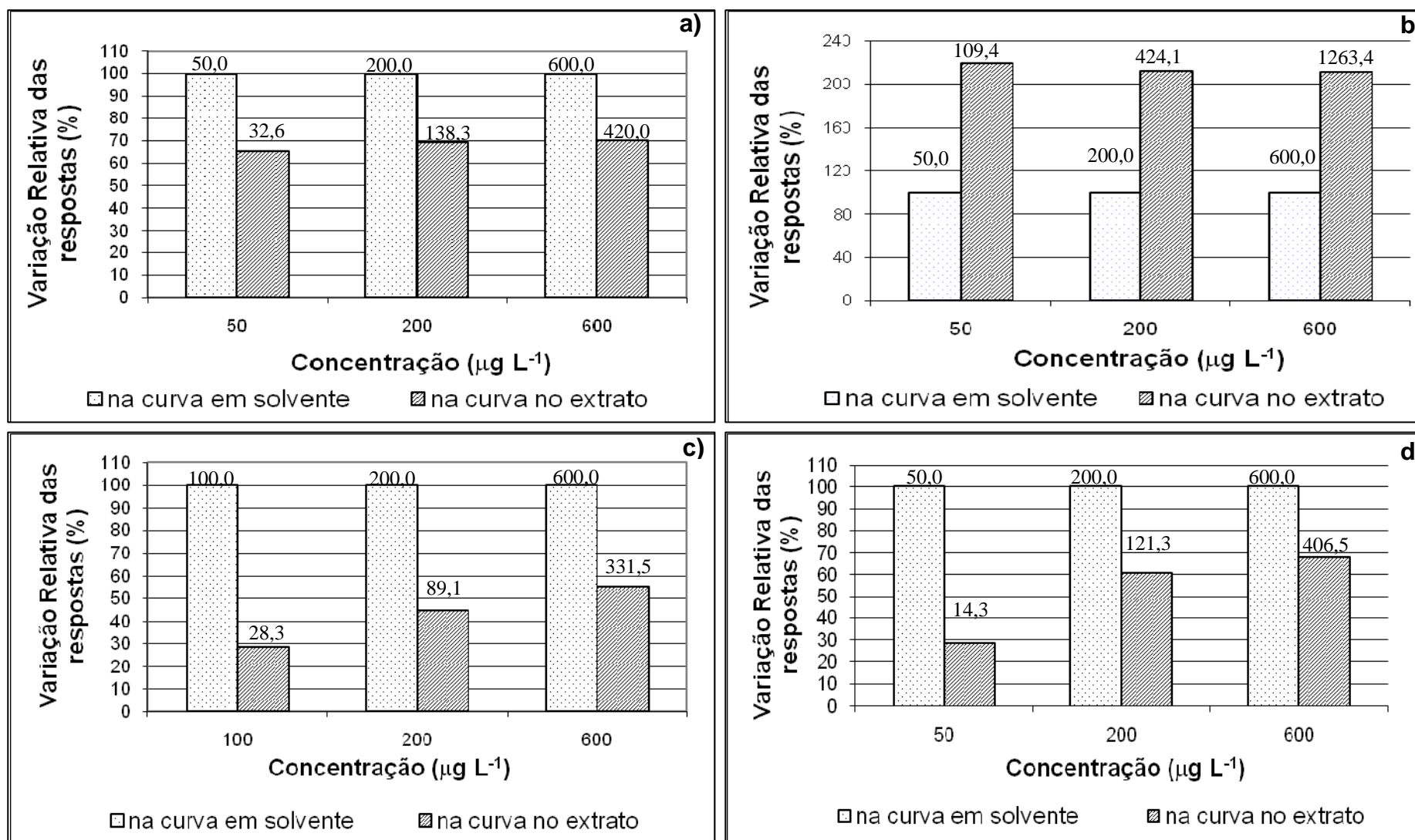


Figura 3.22 – Variação relativa das respostas (Área do analito) calculadas para os princípios ativos (a) clorpirifós, (b) endosulfan, (c) cipermetrina e (d) deltametrina quando utilizada a curva analítica em solvente (100%) e em extratos de alcatra.

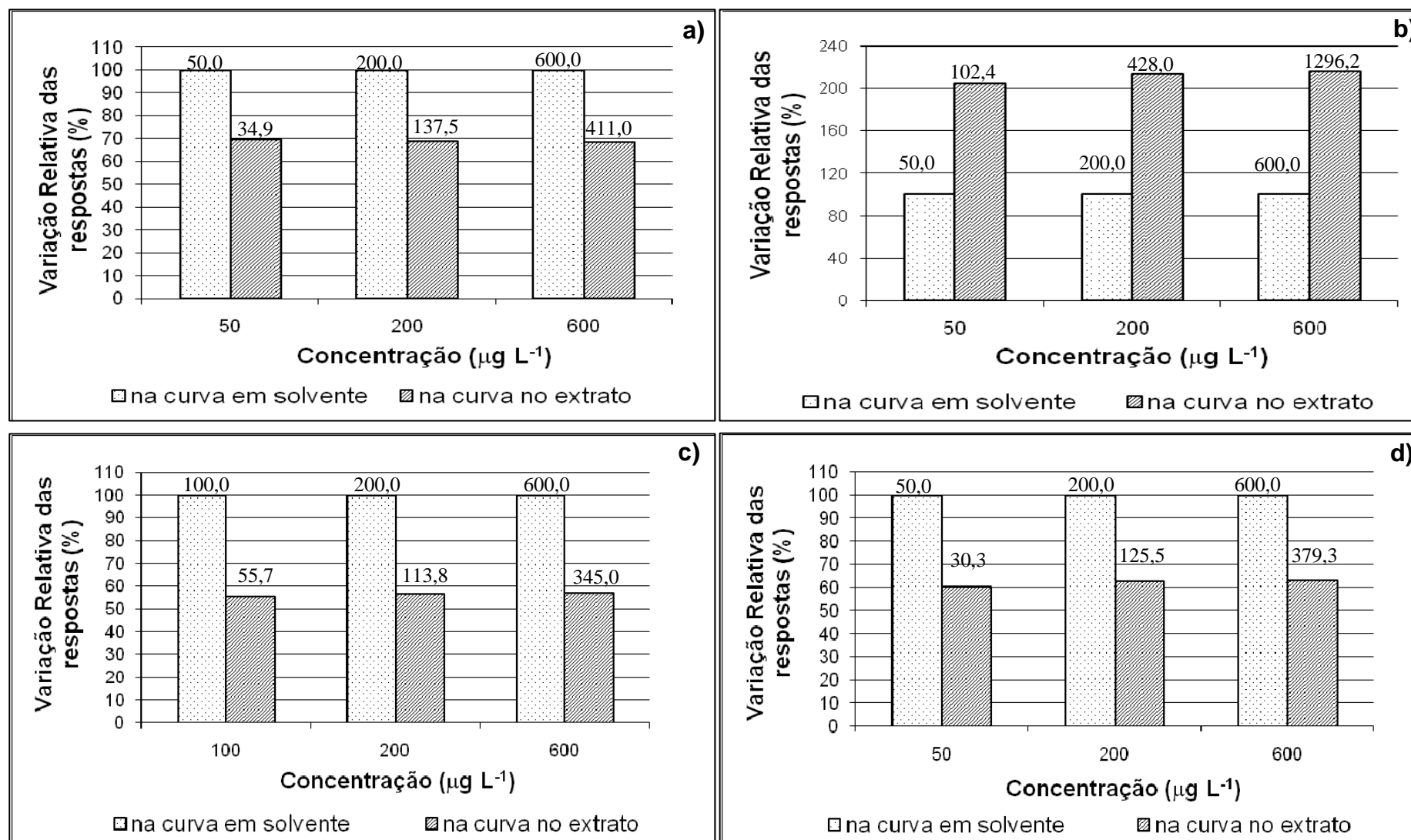


Figura 3.23 – Variação relativa das respostas (Área do analito) calculadas para os princípios ativos (a) clorpirifós, (b) endossulfan, (c) cipermetrina e (d) deltametrina quando utilizada a curva analítica em solvente (100%) e em extratos de fígado.

Para avaliar o efeito de matriz em função da concentração, três valores de resposta do detector ($\text{Área do analito}/\text{área do padrão interno}$) foram utilizados para calcular as respectivas concentrações utilizando a curva analítica em solvente e em extrato da matriz. A resposta de concentração obtida com a curva analítica preparada em solvente foi considerada 100 %, sendo calculada posteriormente a porcentagem relativa para a curva preparada no extrato da matriz. Nas respostas avaliadas (Figura 3.20) para alcatra, o efeito de matriz é mais acentuado para endosulfan e cipermetrina. A deltametrina apresenta efeito de matriz acentuado quando em concentrações mais baixas. Para clorpirifós, cipermetrina e deltametrina, o efeito de matriz diminui com o aumento da concentração, sendo mais acentuada essa diminuição para os piretróides. O endosulfan apresenta um comportamento diferente dos outros compostos tendo maior efeito de matriz para concentrações maiores.

Para amostras de fígado foi observado o mesmo comportamento (Figura 3.21), porém com efeito de matriz menos acentuado para o clorpirifós, cipermetrina e deltametrina quando comparado com as amostras de alcatra. Não foi possível observar diminuição apreciável do efeito de matriz com o aumento da concentração para esses mesmos compostos.

Em artigos que reportam sobre efeito de matriz comenta-se que a adição de um padrão interno ao extrato diminui ou elimina o efeito de matriz. Para estudar este parâmetro, o comportamento do padrão interno foi avaliado comparando-se as variações das respostas obtidas quando empregou-se padrão interno ($\text{Área do analito}/\text{Área do padrão interno}$) com as repostas obtidas sem considerar a adição de padrão interno (Área do analito) quando utilizadas as curvas em acetonitrila e em extrato da matriz. Os resultados apresentados nas Figuras 3.22 e 3.23 para alcatra e fígado respectivamente, mostram que o efeito de matriz utilizando como resposta a área do analito ou a razão área do analito pela área do padrão interno, apresentam a mesma tendência de comportamento para as concentrações avaliadas. Porém, observa-se que o efeito de matriz é mais acentuado para o clorpirifós, cipermetrina e deltametrina, quando não é utilizado o padrão interno. Desta forma, o padrão interno para esses compostos diminui o efeito de matriz além de diminuir erros no volume de injeção, corrigir pequenas variações no fluxo do

gás e na temperatura da coluna, de forma que as respostas cromatográficas não sejam significativamente afetadas. O endosulfan utilizando como resposta a área do analito apresenta menor efeito de matriz do que quando o padrão interno é empregado na curva analítica e no cálculo da porcentagem de recuperação, porém esta diferença não é muito acentuada.

Outra maneira de avaliar este efeito de matriz é verificar o aumento gradativo da resposta (áreas) na análise cromatográfica. Para avaliar a variação da resposta do detector, na extração dos agrotóxicos por ESL-PBT, soluções padrão dos agrotóxicos, em acetonitrila, foram analisadas antes e após injeções sucessivas de extrato de alcatra ou fígado obtido na aplicação da metodologia ESL-PBT em amostra carne bovina isenta dos princípios ativos estudados.

A Figura 3.24 (a e b) representam as variações das áreas dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina e também do padrão interno, bifentrina, em alcatra e fígado respectivamente, comparando-se as respostas do detector antes e após a saturação do sistema cromatográfico por componentes da matriz.

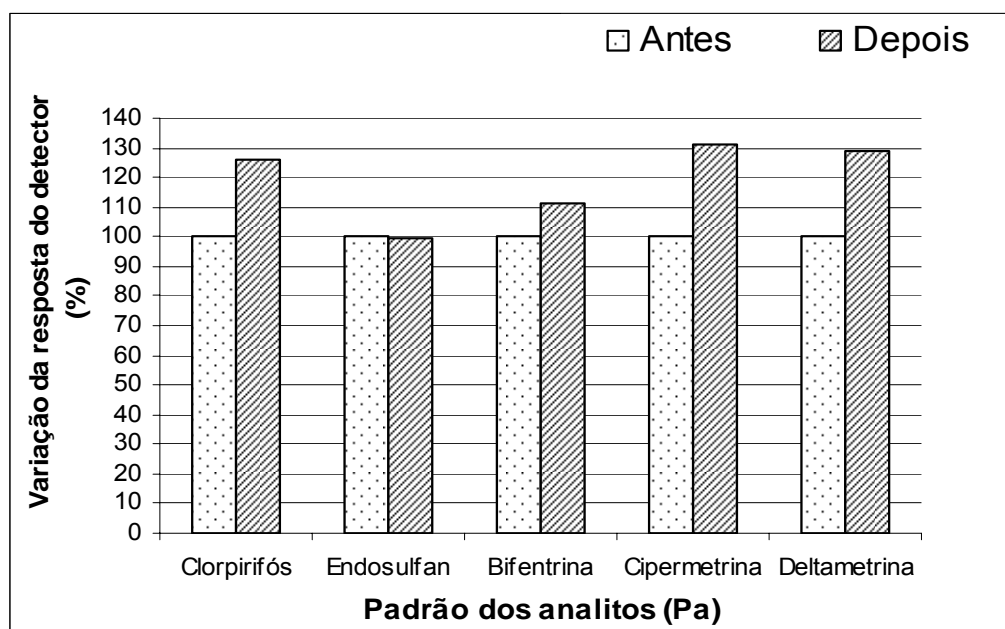


Figura 3.24.a – Avaliação da taxa de aumento da resposta do detector para os agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina, deltametrina e para o padrão interno, bifentrina, em acetonitrila após saturação do sistema cromatográfico com componentes da matriz de alcatra.

O clorpirifós, cipermetrina e deltametrina são os agrotóxicos mais afetados pelo efeito de matriz, pois o aumento da resposta foi de 26 %, 30 % e 29 %, respectivamente. A resposta do endosulfan não sofreu aumento após a saturação do sistema cromatográfico. O padrão interno utilizado também apresentou efeito de matriz, pois se trata de um piretróide que são compostos largamente afetados pelo efeito de matriz, devido à elevada massa molar, o que dificulta a volatilização desses no injetor (SANCHEZ-BRUNETE et al, 2005), sua resposta aumentou 11 % após a saturação do sistema cromatográfico.

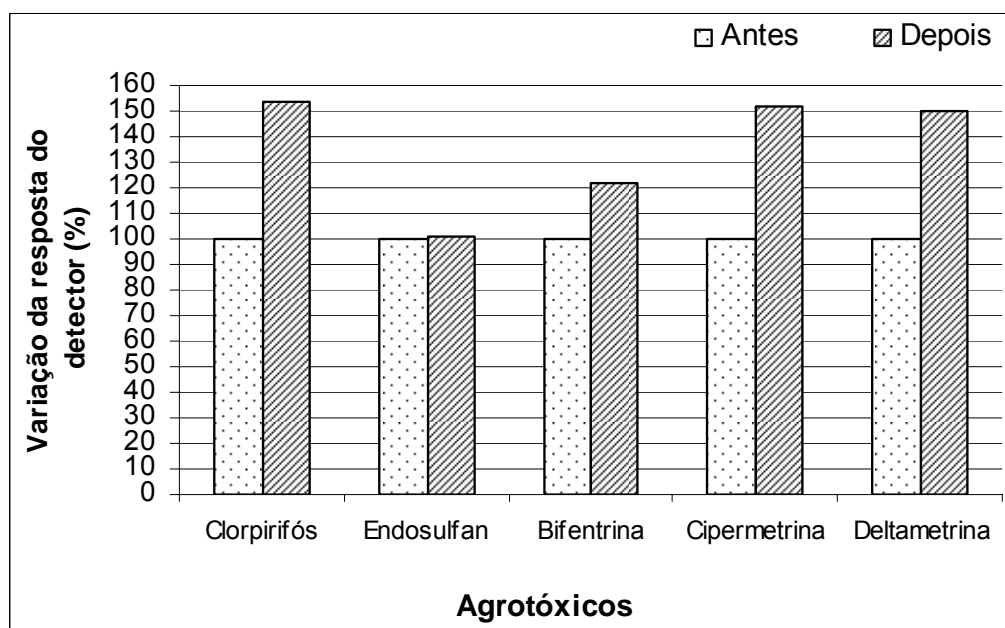


Figura 3.24b – Avaliação da taxa de aumento da resposta do detector para os agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina, deltametrina e para o padrão interno, bifentrina, em acetonitrila após saturação do sistema cromatográfico com componentes da matriz de fígado.

O mesmo comportamento foi observado para os agrotóxicos clorpirifós, cipermetrina e deltametrina em amostras de fígado bovino, com aumento da resposta de 53 %, 52 % e 50 %, respectivamente, porém a variação da resposta foi mais pronunciada quando o sistema cromatográfico é saturado com extratos de fígado quando comparados aos extratos de alcatra, isso devido à maior complexidade da matriz, sendo assim, extraída uma maior quantidade de constituintes da matriz. O padrão interno utilizado também apresentou efeito de matriz com aumento da resposta de 22 % após a

saturação do sistema cromatográfico. Para o endosulfan o aumento da resposta do detector também foi desprezível.

Realizando a mesma avaliação, porém, utilizando a quantificação pelo método do padrão interno, ou seja, a razão entre as áreas do padrão pela área do padrão interno é possível avaliar o comportamento do padrão interno sobre o efeito de matriz (Figura 3.25.a e Figura 3.25.b para alcatra e fígado respectivamente).

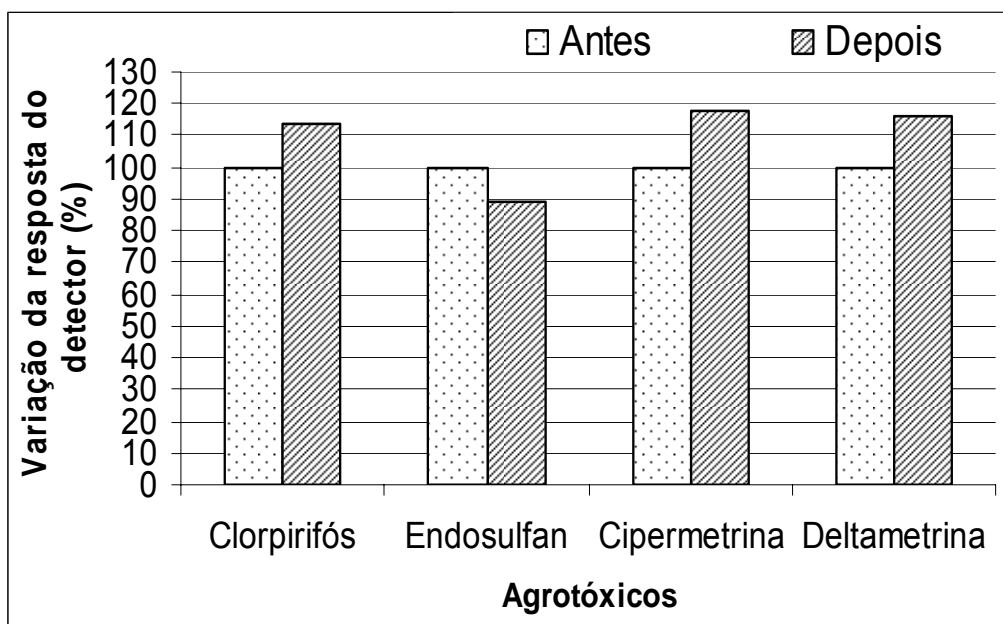


Figura 3.25.a – Avaliação do aumento da resposta do detector para os agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina em acetoneitrila após saturar o sistema cromatográfico, utilizando a razão área do padrão pela área do padrão interno para obter a porcentagem utilizando extratos de alcatra.

A utilização do padrão interno diminui erros no volume de injeção, pequenas variações no fluxo do gás de arraste e na temperatura da coluna. Porém, é possível observar através das Figuras 3.13 (a e b) que a utilização do padrão interno, bifentrina, na construção da curva analítica e no cálculo da porcentagem de recuperação dos agrotóxicos, diminui a variação da resposta do detector após saturação do sistema cromatográfico, diminuindo o efeito de matriz, para o clorpirifós, cipermetrina e deltametrina. Como é um composto que também apresenta efeito de matriz, ele diminui o efeito de matriz em amostras com efeito de matriz acentuado. Entretanto para o endosulfan, composto que não apresenta aumento da resposta, a sua utilização no cálculo

da porcentagem de recuperação faz com que ocorra a variação da resposta de forma, há uma diminuição de 10,6 % da resposta do detector após a saturação do sistema cromatográfico, correspondente à porcentagem de aumento que a bifentrina sofre após a saturação do sistema cromatográfico.

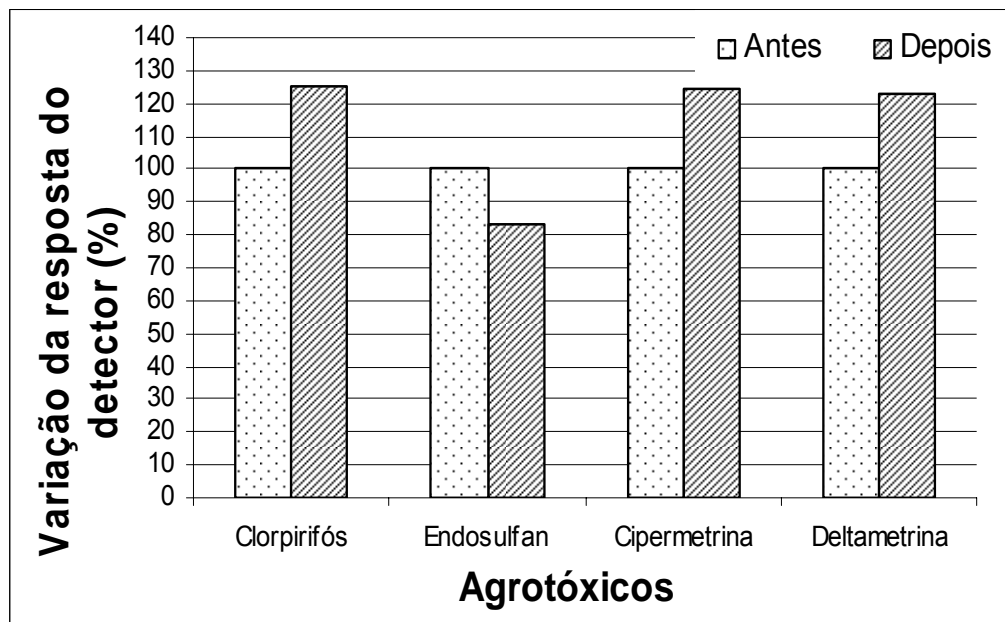


Figura 3.25.b – Avaliação do aumento da resposta do detector para os agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina em acetonitrila após saturar o sistema cromatográfico, utilizando a razão área do padrão pela área do padrão interno para obter a porcentagem utilizando extratos de fígado.

Constata-se que entre os analitos estudados em matrizes de carne bovina que o clorpirifós, a deltametrina e a cipermetrina sofrem um efeito de matriz “positivo”, ou seja, a resposta do detector aumenta quando esses analitos são injetados na presença de componentes da matriz. Foi possível observar que a utilização da bifentrina, padrão interno que para essa matriz apresenta o efeito de matriz semelhante a deltametrina e cipermetrina, diminui o efeito de matriz para esses compostos. Porém, no caso do endosulfan, analito que em matrizes de carne bovina sofrem efeito de matriz “negativo”, ou seja, a resposta do detector é menor quando são injetados na presença de componentes da matriz, a utilização da bifentrina, que possui efeito de matriz “positivo” acentua a diminuição da resposta.

3.11. DETERMINAÇÃO DOS AGROTÓXICOS CLORPIRIFÓS, ENDOSULFAN, CIPERMETRINA E DELTAMETRINA EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE ALCATRA E FÍGADO BOVINO

A técnica de ESL-PBT otimizada foi aplicada em três amostras de alcatra e fígado bovino, 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 agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi otimizada e validada a metodologia ESL-PBT, para análise simultânea dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina em alcatra e fígado bovino.

Na etapa de otimização foram avaliados: massa da amostra, tempo de fortificação, tempo de agitação, força iônica da solução aquosa, composição da mistura extratora, efeito do ultra-som e etapa de *clean up* para determinação das melhores condições de análise dos compostos de interesse.

A metodologia ESL-PBT mostrou-se eficiente para análise dos resíduos dos agrotóxicos estudados, com porcentagens de recuperação acima de 70 %. Além disso, a metodologia apresentou baixo consumo de solvente e extratos limpos, não necessitando de etapas de purificação para análise cromatográfica, que levam à diminuição da porcentagem de recuperação dos analitos estudados, além de adicionar mais uma etapa ao procedimento de extração, tornando a técnica mais dispendiosa e cara.

Os parâmetros avaliados no processo de validação, tais como: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão indicaram que a metodologia ESL-PBT é eficiente para a extração dos resíduos de clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina em carne bovina com limites de detecção abaixo dos LMR estabelecidos para estes agrotóxicos neste tipo de matriz.

Foi observada a presença de efeito da matriz na análise cromatográfica dos compostos de interesse, obtendo-se porcentagens de recuperação acima de 70 % quando a curva analítica preparada em extratos orgânicos fortificados foi utilizada para quantificação dos compostos. O efeito da matriz foi semelhante tanto em alcatra e fígado bovino.

Para utilizar a DMFS e a ESL-PBT associada à DMFS em amostras de carne é necessário realizar novas etapas na otimização, avaliando outras variáveis.

A metodologia ESL-PBT otimizada e validada foi aplicada em amostras de alcatra e fígado bovino adquiridos no comércio de Viçosa-MG, não sendo encontrado resíduo dos agrotóxicos clorpirifós, endosulfan, cipermetrina e deltametrina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANASTASSIADES, M.; MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides; **Journal of Chromatography A**, **1015**: 163-184, 2003.

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

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia>. Acessado em: 24 de fevereiro de 2008.

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

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução nº 899, de

29/05/2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**.
Brasília, 2003.

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

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

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 172-175, 2001.

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

BRAGA, R. M. **Considerações para o controle do carrapato, mosca dos chifres, e vermes gastrointestinais em bovinos de Roraima – Circular Técnica 01** – Embrapa e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – 2002.

BRASIL, 1989 - Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Estabelece as Diretrizes e Bases da Educação Nacional. **Diário Oficial União**, Brasília, DF, 12 de julho de 1989.

BRASIL, 1999 - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 42, DE 20 DE DEZEMBRO DE 1999.
Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16717>. Acessado em 01 de agosto de 2008.

BRASIL, 2007 - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 9 de 30 de março de 2007. **Diário Oficial da União**. Brasília, 4

de abril de 2007, Sessão 1 pag 6-10.

BRITO, N. M.; DE AMARANTE JR. O. P.; POLESE, L.; SANTOS, T. C. R.; RIBEIRO, M. L. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente. 12**: 155-166, jan/dez. 2002.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochim Acta, 128**: 93-106, 1998.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira, São Paulo, **Rev. Saúde Pública**, v.34, n.5, p.529-537, 2000.

CARDOSO, M. H. W. M., NOBREGA, A. W., ABRANTES, S. Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz: estudo de caso em tomates, **Revista Analytica**. Maio 2008. n.34

CARVALHO, J. P. P.; NISHIKAWA, A. M.; FAY, E. F. Níveis de resíduos de praguicidas organoclorados em produtos cárneos sob inspeção federal. **Ver. Saúde públ.**, S. Paulo, **14**: 408-19, 1980.

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

http://www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp. Acessado em 01/07/2008

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

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. e BONATO, P. S. **Fundamentos de**

Cromatografia, editora Unicamp, Campinas, São Paulo, 290p, 2006.

COSTABEBER, I.; SIFUENTES DOS SANTOS, J.; ODORISSI XAVIER, A. A.; WEBER, J.; LEAL LEÃES, F.; BOGUSZ JUNIOR, S.; EMANUELLI, T. Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) in meat and meat products from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food and Chemical Toxicology**, **44**: 1–7, 2006.

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

DEEMA, P.; THOMPSON, E.; WARE, G. W. Metabolism, storage and excretion of 14C-Endosulfan in mouse. **Journal of the Economic Entomology**, **59**: 546-550, 1966.

DOROUGH, H. W.; GIBSON, J. R. Chlorinated insecticide residues in cigarettes purchased 1970-72. **Environmental Entomology**, v.1, n.6, p. 739-743, 1972.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Conhecendo a carne que você consome**. Campo Grande, MS, 1999.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Práticas de manejo sanitário em bovinos de leite**. Juiz de Fora, MG, p.65, 2000.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Práticas de manejo sanitário em bovinos de leite**. Juiz de Fora, MG, 2004

EURACHEM WORKING GROUP. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. 1998.

EXTOXNET, 2002 - Extension Toxicology Network. Disponível em: <http://extoxnet.orst.edu/>. Acessado em 08/2008

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization. World Health Organization. International program on chemical safety. In: **JOINT MEETING ON PESTICIDE RESIDUES (JMPR)**, Genebra, 1991. Genebra: WHO, 1992. 35 p.

FAOSTAT/FAO - Food And Agriculture Organization Of The United Nations
<http://faostat.fao.org/faostat/collections?hasbulk=0&subset=FoodQuality&&language=EN>. Acessado em 01/07/2008

http://faostat.fao.org/faostat/pestdes/pest_ref/pest-e.htm#E9E1. Acessado em 01/07/2008

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B., MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.

GARRIDO-FRENICH, A.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; MARTÍNEZ-VIDAL, J. L.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; HERRERA-ABDO, M. A. Characterization of recovery profiles using a gas chromatography – triple quadrupole mass spectrometry for the determination of pesticides residues in meat samples. **Journal of Chromatography A**, **1133**: 315-321, 2006

GARRIDO-FRENICH, A.; MARTINEZ-VIDAL, J. L.; CRUZ-SICILIA, A. D.; GONZÁLEZ-RODRIGUEZ, M. J.; PLAZA-BOLAÑOS, P. Multiresidue analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides in muscle of chicken, pork and Lamb by gas chromatography – triple quadrupole mass spectrometry. **Analytical Chimica Acta**, **558**: 42-52, 2006.

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.

GOBO, A. B.; KURZ, M. H. S.; PIZZUTTI, I. R., ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Development and validation of methodology for the determination of residues of

organophosphorus pesticides in tomatoes. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 15, n. 6, p. 945-950, 2004.

GOEBEL, H.; GORBACH, S.; KNAUF, W.; RIMPAU, R. H.; HÜTTENBACH, H. **Properties, effects, residues, and analytics of the insecticide Endosulfan.** New York: Springer-Verlag, 174 p. 1982.

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 - MG.

GOULART, S. M. ; QUEIROZ, M. L. R.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, **75**: 1320–1323, 2008.

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

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

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

HUBER, W. G. Chemical in animal products. In: Hubbert, W.T. et al, ed.

Diseases transmitted from animal to man. 6th ed. Springfield, Ill., Charles C. Thomas, 1975. p. 1073-83.

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

INCHEM, 1975. IPCS INCHEM: Pesticide Documents. Disponível em: http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest18_e.htm. Acessado em 01/08/2007.

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.

KAN, C. A.; MEIJER, G. A. L. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. **Animal Feed and Technology**, **133**: 84-108, 2007.

KOCOUREK, V.; HAJŠLOVÁ, J.; HOLADOVÁ, K.; POUŠTKA, 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.

KISHIDA, K. Quantitation and confirmation of six sulphonamides in meat by liquid chromatography-mass spectrometry with photodiode array detection. **Food Control**, **18**: 301-305, 2007.

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.

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

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

LANÇAS, F. M., The role of the separation sciences in the 21 th century, 2003. in: DÓREA, H. S.; LOPES, W.G. Aplicação da técnica de Dispersão da Matriz em fase sólida (DMFS) na análise de pesticidas em quiabo por CG-EM. **Química Nova**, v.27, n.6, 2004b.

LARA, W. H.; BATISTA, G.C. Pesticides. **Química Nova**, v.15, n.2, 1992.

LARA, W. H.; BARRETO, H. H. C. Resíduos de pesticidas clorados em alimentos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, S. Paulo, **32**: 89-94, 1972.

LEAL, A. T.; FREITAS, D. R. J.; VAZ Jr, I. S. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta Scientiae Veterinarie**, **31 (1)**: 1-11, 2003.

LEHR, W. **Statement concerning soil metabolism and mobility of Endosulfan (Hoe 002671)**. Frankfurt: HOECHST, 1992. p.1-8.

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.

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.

MOREIRA, L. F. **Diagnóstico dos problemas ecotoxicológicos causados pelo uso de inseticidas (metamidofós) na região agrícola de viçosa-MG.** 1995. 95f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.

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

PATEL, K.; FUSSELL, R. J.; HETMANSKI, M.; GOODALL, D.; KEELY, B. J. Evaluation of gas chromatography – tandem quadrupole mass spectrometry for the determination of organochlorine pesticides in fats and oils. **Journal of Chromatography A**, **1068:** 289-296, 2005.

PAULA, R. T. de. **Mobilidade de atrazine e ametryn em latossolo vermelho amarelo.** Viçosa – MG, 2007. 85f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa.

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

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa, **Química Nova**, 2008, *no prelo*.

POOLE, C. F. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, **1158:** 241-

250, 2007.

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

RONNING, H. T.; EINARSEN, K.; ASP, T. Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with LC-tandem MS, and the validation of the method based on 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, **1118**: 226-233, 2006.

SALLAM, K. I.; MORSHEDY, A. E. M. A. Organochlorine pesticides residues in camel, cattle and sheep carcasses slaughtered in Sharkia Province, Egypt. **Food Chemistry**, **108**: 154-164, 2008

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

SANNINO A.; BOLZONI L.; BANDINI M. Application of liquid chromatography with electro spray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A** **1036**:161-169, 2004.

SANTOS, H. M.; CAPELO, J. L. Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. **Talanta**, **73**: 795-802, 2007.

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

SEO, J.; KIM, H.; CHUNG, B. C.; HONG, J. Simultaneous determination of anabolic steroids and synthetic hormones in meat by freezing-lipid filtration,

solid-phase extraction and gas chromatography –mass spectrometry. **Jornal of Chromatography A**, **1067**: 303-309, 2005

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**, v. 22, n. 2, p. 197-200, 1999.

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

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.

STOPPELLI, I. M. B. S.; MAGALHÃES, C. P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciência e saúde coletiva**, 10(sup.):91-100, 2005.

STUMPF, K.; ABHAVER, J. **An up-to-date review of the environmental chemistry of Endosulfan**. Frankfurt: HOECHST, 1986. 23 p.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, **74**: 835-855, 2002.

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. 65 f.

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, **Quimica. Nova**, Vol. 30, No. 3, 535-540, 2007.

WENZEL, I. M.; Barci, L. A. G.; Almeida, J. E. M.; Gassen, M. H.; Prado, A. P. Compatibilidade do Fungo *Beauveria Bassiana* com carrapaticidas químicos utilizados no controle de *Boophilus Microplus* (acarí:ixodidae). **Arq.Inst.Biol.**, São Paulo, v.71, (supl.), p.1-749, 2004

WHO - Environmental Health Criteria. Cypermethrin. Who Technical Report Series, N. 82, (1989).

Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc82.htm>.

Acessado em 19 de novembro de 2003.

WHO. Environmental Health Criteria. Deltamethrin. Who Technical Report Series, N.97, (1990).

Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc97.htm>.

Acessado em 01/03/2008.

ZROSTLÍKOVA, J.; HAJŠLOVÁ, J.; GODULA, M.; MAŠTOVSKÁ. Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **Journal of Chromatography A**, **937**: (1-2), 73-86, 2001.