

IGOR CABREIRA PUSSENTE

**EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO E PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA
(ESL-PBT) DE CLORPIRIFÓS, THIAMETHOXAM E DELTAMETRINA EM MAÇÃ
E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

IGOR CABREIRA PUSSENTE

**EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO E PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA
(ESL-PBT) DE CLORPIRIFÓS, THIAMETHOXAM E DELTAMETRINA EM MAÇÃ
E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA**

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

APROVADA: 20 de novembro de 2008.

Prof. Carlos Roberto Bellato

Profa. M^a. do Carmo Hespanhol da Silva

Prof. Antônio Jacinto Demuner

Prof. Antônio Augusto Neves
(Coorientador)

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

*“A mente que se abre a uma nova idéia,
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

(Albert Einstein)

*À Deus,
Aos meus pais Antonio e Angela,
À minha irmã Aline,*

Com amor dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me acompanhado em toda essa trajetória me dando força e amparo nas horas de cansaço, me ajudando e iluminando nas horas mais difíceis.

Agradeço de todo o coração, aos professores, Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e Antônio Augusto Neves, pelos ensinamentos, incentivo, confiança, conselhos, orientação constante e pela oportunidade de mais um sonho realizado. Vocês fazem parte de muito do que sou hoje como profissional e como ser humano.

Aos professores Carlos Roberto Bellato, Antonio Jacinto Demuner e Maria do Carmo Hespanhol da Silva pela participação na banca.

Aos meus pais e a minha irmã, pela paciência que tiveram nos momentos de angústia, pelo incentivo ao crescimento, por todo carinho e atenção dedicada, pelo amor incondicional, pelo exemplo de dignidade, perseverança e humanidade. Amo muito vocês.

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

A todos os amigos do laboratório de química analítica – LAQUA: Leila, Aline, Ana Beatriz, Armanda, Jussara, Deyse, Érica, Flaviane, Kamilla, Jaqueline, Simone, Rodrigo, Ricardo e Elenice, pelo auxílio, aprendizado, amizade e pelos momentos de descontração. Em especial à Gevany, pelos preciosos, incontáveis e pacientes momentos de discussão e conselhos.

BIOGRAFIA

IGOR CABREIRA PUSSENTE, filho de Antônio Carlos Pussente e Angela Maria Cabreira Pussente, nasceu em Caratinga, Minas Gerais, em 31 de Dezembro de 1981.

Em março de 2001, iniciou o curso de graduação em Química pela Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se em licenciatura em julho de 2005. Em seguida, especializou-se em Ensino de Química pelo Centro Universitário de Caratinga. Em 2006, foi admitido no curso de pós-graduação em Agroquímica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em novembro de 2008.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O uso de Agrotóxicos.....	1
1.2. Cultivo da Maçã	4
1.3. Agrotóxicos	6
1.3.1. Piretróides - Deltametrina	7
1.3.2. Organofosforados - Clorpirifós.....	8
1.3.3. Neonicotinóides – Thiamethoxam.....	9
1.4. Análises de agrotóxicos	11
1.5. Extração Sólido-Líquido e Purificação em Baixa Temperatura (ESL-PBT)	13
1.6. Efeito de matriz	14
1.7. OBJETIVOS.....	19
1.7.1. Objetivos Gerais	19
1.7.2. Objetivos Específicos	19
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
2.1. Preparo de soluções padrão de agrotóxicos.....	20
2.2. Preparo de amostras de maçãs fortificadas.....	20
2.3. Otimização da técnica de extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT).....	21
2.3.1. Planejamento Fatorial 2 ³	21
2.3.2. Etapa de <i>clean up</i>	22
2.3.3. Método otimizado da ESL-PBT e análise por cromatografia gasosa de três agrotóxicos em maçã.	23
2.4. Análise Cromatográfica.....	24
2.5. Validação do método analítico	25
2.5.1. Seletividade	25
2.5.2. Faixa de Trabalho.....	25
2.5.3. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) do aparelho e método	26
2.5.4. Precisão.....	26

2.6. Avaliação do efeito de matriz na quantificação dos agrotóxicos por cromatografia gasosa	27
2.6.1. Curva analítica preparada em solvente puro	27
2.6.2. Curva analítica preparada em extratos de amostras isentas de agrotóxicos	28
2.6.3. Curva analítica após saturação do sistema	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1. Análise cromatográfica	29
3.2. Otimização da técnica de extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT).....	30
3.2.1. - Planejamento Fatorial 2 ³	30
3.2.2. Eficiência da etapa de clean-up dos extratos obtidos na ESL-PBT de amostras de maçãs	33
3.3. Metodologia otimizada para extração de clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina em maçã.....	36
3.4. Validação do método analítico	36
3.4.1. Seletividade	37
3.4.2. Linearidade da resposta do detector	38
3.4.3. Limite de detecção e limite de quantificação	41
3.4.4. Precisão.....	42
3.4.5. Exatidão.....	44
3.5. Avaliação do efeito de matriz.....	46
3.6. Determinação dos agrotóxicos clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina em amostras comerciais de maçã.....	51
4. CONCLUSÃO.....	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

RESUMO

PUSSENTE, Igor Cabreira M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2008. **Extração Sólido-Líquido e Partição em Baixa Temperatura (ESL-PBT) de Clorpirifós, Thiamethoxam e Deltametrina em Maçã e Análise por Cromatografia Gasosa.** Orientador: Maria Eliana L. R. de Queiroz. Coorientadores: Antônio Augusto das Neves e César Reis.

O objetivo deste trabalho foi otimizar e validar a técnica extração sólido-líquido e partição em baixa temperatura (ESL-PBT) para análise de resíduos dos agrotóxicos clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina em amostras de maçã por cromatografia. Na etapa de otimização, as condições ideais para extração dos agrotóxicos de interesse de amostras de maçã fortificadas, foram determinadas empregando um planejamento fatorial. Foram avaliados: composição da mistura extratora, tipo de agitação e o tempo, força iônica da solução aquosa e *clean up* do extrato, para determinação das melhores condições de análise dos compostos de interesse. As amostras de maçã e a mistura extratora em fase única foram agitadas e deixadas em freezer por aproximadamente 8 horas. A matriz e a fase aquosa congeladas, com o abaixamento de temperatura, foram separadas da fase superior (solvente orgânico) ainda líquida. Esta fase foi submetida à etapa de *clean-up* e analisada por cromatografia gasosa, utilizando bifentrina como padrão interno. A técnica otimizada consiste em acrescentar a 3,0000 g de maçã, 1,0 mL de solução aquosa de NaH_2PO_4 a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, 6,5 mL de acetonitrila, 1,5 mL de acetato de etila e submeter essa mistura a agitação mecânica por 30 minutos seguida de congelamento. Posteriormente, eluir o sobrenadante em uma coluna de 10,0 cm contendo 2,0000 g de florisil e 1,5000 g de sulfato de sódio anidro e analisar o extrato (10,0 mL) por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons. A etapa de *clean-up* foi necessária para minimizar a quantidade de interferentes provenientes da amostra, mas não prejudicou as porcentagens de recuperação dos analitos de interesse. O método otimizado foi validado determinando-se a seletividade, linearidade do detector, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão. Os resultados mostraram que a ESL-PBT otimizada é seletiva, não apresentando picos interferentes. A técnica apresentou r^2 médio de 0,992 quando se analisou a faixa de trabalho de 25,0 a $500,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Os limites de detecção e quantificação do método estabelecido para o clorpirifós

foi de 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, para o inseticida thiamethoxam foi de 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para a deltametrina foi de 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. A precisão foi dividida em repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade apresentou coeficientes de variação entre 2,1% e 3,6% e a precisão intermediária obteve um coeficiente de variação máximo de 6,6%. A exatidão obteve coeficientes de variação entre 1,3 e 8,6% para o clorpirifós, 5,1 e 9,2% para o thiamethoxam e 5,1 e 16,2% para a deltametrina. A ESL-PBT se mostrou eficiente para análise de resíduos dos agrotóxicos de interesse em maçã com porcentagens de recuperação maiores que 70 % e limites de detecção abaixo dos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pela legislação brasileira para estes agrotóxicos neste tipo de alimento. A quantificação de agrotóxicos em matrizes complexas por cromatografia gasosa pode ser afetada pelos componentes da matriz. Neste trabalho, o efeito de matriz foi estudado, empregando curvas analíticas preparadas em solvente puro e em extratos de maçã (brancos) fortificados para quantificação dos agrotóxicos em extratos de maçã. Os resultados mostraram que os componentes da matriz podem afetar a quantificação dos agrotóxicos estudados. Entretanto, um estudo mais aprofundado deverá ser realizado para poder compreender melhor este fenômeno e sugerir formas adequadas para reduzir o efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos em matrizes complexas por cromatografia gasosa. A técnica otimizada e validada foi aplicada em amostras de maçã adquiridas no comércio da cidade de Viçosa-MG. Nas amostras analisadas, foi constatada a presença de resíduos dos agrotóxicos clorpirifós na faixa de 0,25 a 0,30 $\mu\text{g L}^{-1}$, concentrações inferiores às permitidas pela legislação brasileira.

ABSTRACT

PUSSENTE, Igor Cabreira M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, november of 2008. **Extraction Solid-Liquid and Partition Technique at Low Temperature (ESL-PBT) of Chlorpyrifos, Thiamethoxan e Deltametrin in Apple for Gas Chromatographic.** Adviser: Maria Eliana L. R. de Queiroz. Co-Advisers: Antônio Augusto das Neves and César Reis.

The objective of this work was to optimize and validate a solid-liquid extraction and partition technique at low temperature (ESL-PBT) for analysis of the pesticides chlorpyrifos, thiamethoxam and deltamethrin in apple samples by chromatography. During optimization, ideal conditions for extraction of the pesticides of interest from the apple samples were determined by employing a factorial experimental setup. Composition of the extracted mixture, agitation type and time, ionic force of the aqueous solution and clean-up of the extract were evaluated to determine the best conditions for analysis of the compounds of interest. The apple samples and an extractor mixture in a single phase were agitated and frozen for approximately 8 hours. The matrix and frozen aqueous phase were separated from the still liquid (organic solvent) upper phase when lowering the temperature. This phase was submitted to a clean-up step and analyzed by gas chromatography, using bifentrin as an internal standard. The optimized technique consisted of preparing a solution of 3.0000 g of apple, 1.0 mL of an aqueous NaH_2PO_4 (0.2 mol L^{-1}), 6.5 mL acetonitrile, 1.5 mL ethyl acetate and the mixture was submitted to mechanical agitation for 30 minutes and then frozen. After this step, the supernatant was separated in a 10.0 cm column containing 2.0000 g of florisil and 1.5000 g of anhydrous sodium sulfate and the extract (10.0 mL) was analyzed by gas chromatography with an electron capture detector. The clean-up stage was necessary to minimize the interferences in the sample, but did not jeopardize the recovery percentages of the analytes of interest. The optimized method was validated by determining selectivity, detector linearity, detection and quantification limits, precision and accuracy. The results show that optimized ESL-PBT is selective and shows no interference peaks. This technique presented an average r^2 value of 0.992 when analyzing the working range of 25.0 to 500.0 $\mu\text{g L}^{-1}$. The detection and quantification limits of the established method for chlorpyrifos were

2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 5.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, for the thiamethoxam pesticide were 5.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 15.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ and for deltamethrin were 10.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 20.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Precision was divided in repeatability and intermediate precision. Repeatability presented coefficients of variation between 2.1% and 3.6% and intermediate precision obtained a maximum coefficient of variance of 6.6%. Accuracy showed coefficients of variation between 1.3% and 8.6% for chlorpyrifos, 5.1% and 9.2% for thiamethoxam and 5.1 and 16.2 for deltamethrin. The ESL-PBT showed to be efficient for analysis of the pesticide residues of interest in apple with recovery percentages greater than 70% and detection limits lower than the maximum limits of the residues (LMR) established by Brazilian legislation for these pesticides in this type of food. Quantification of pesticides in complex matrixes by gas chromatography can be affected by matrix components. In this work, the effect of the matrix was studied, employing analytical curves prepared in pure solvent and in apple extracts (control) for quantification of pesticides in apple extracts. The results showed that the matrix components can affects the quantification of the pesticides studied. However, a deeper study should be performed to better understand this phenomenon and propose suitable methods to reduce the matrix effect on quantification of pesticides in complex matrices by gas chromatography. The optimized and validated technique was applied in apple samples acquired commercial in the city of Vicosa, MG, Brazil. In the analyzed samples, the presence of the pesticide residue chlorpyrifos was found in the range of 0.25 to 0.30 $\mu\text{g L}^{-1}$, concentrations inferior to those permitted by Brazilian legislation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O uso de Agrotóxicos

O urbanismo e o anseio pela possibilidade de melhoria na qualidade de vida levaram o deslocamento do homem do campo para os centros urbanos. Para se ter uma idéia, em 1800, apenas 2,5% da população mundial vivia nas cidades. Já no século XX, esta população chegou a 50%. No Brasil, segundo o IBGE, cerca de 20% da população se encontra no campo atualmente (IBGE, 2008).

Em conseqüência do êxodo rural, as áreas agrícolas produtivas foram reduzidas para acomodar a expansão das cidades levando a uma menor produção de alimentos (Embrapa, 2008).

Para atender à enorme demanda por alimentos com essa redução de área, surgiram então, agroecossistemas e monocultivos. Essas novas modalidades de produção agrícola favoreceram o aparecimento de pragas, doenças, ervas daninha e microrganismos, decorrentes do desequilíbrio que atingiu essas populações (BARBOSA, 2004). Esse desequilíbrio traz sérios problemas para a produção de alimentos, levando ao uso de agrotóxicos, fertilizantes e outros.

A sociedade moderna enfrenta o problema da contaminação e o acúmulo de resíduos indesejáveis de agrotóxicos no meio ambiente, devido principalmente, ao desrespeito aos procedimentos seguros de armazenamento, distribuição e uso destes compostos químicos (RIBEIRO *et al.*, 2007). O uso desenfreado e incorreto de agrotóxicos gera danos à saúde pública, comprometimento da qualidade dos recursos hídricos utilizados para o consumo humano, restrições ao uso do solo, além de danos ao meio ambiente (Embrapa, 2008).

Todo o contexto de contaminação gera uma preocupação em se conhecer as características físicas, químicas e biológicas, intrínsecas de cada composto e de cada matriz. Isto permite a identificação das informações sobre reatividade, toxicidade e mobilidade desses compostos nos diferentes setores do ambiente, como solo, vegetais, frutas, etc. (SANTOS, 2002). Sabe-se hoje, por exemplo, que os agrotóxicos com características mais lipofílicas podem se acumular nos tecidos adiposos de animais, contaminando toda a cadeia alimentar, (D'AMATO *et al.*, 2002), interferindo diretamente na saúde humana, e na sobrevivência de alguns animais.

Estes conhecimentos aliados a um programa de análise de resíduos de agrotóxicos, permitem um monitoramento detalhado do comportamento dos princípios ativos no ambiente. Isto favorece a tomada de ações da vigilância sanitária, focadas na prevenção e controle no manejo destes produtos.

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 especial o mercado europeu (D'AMATO *et al.*, 2002).

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

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

Em 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA), implantou um Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) com a participação de vários estados brasileiros e laboratórios de análise de resíduos de agrotóxicos. Até 2007, participaram do PARA as Vigilâncias Sanitárias dos estados do Acre, Alagoas, Amazonas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rondônia, Santa Catarina, São Paulo, Sergipe e Tocantins.

O PARA monitorou de 2002 a 2007 os níveis de agrotóxicos presentes em nove tipos de alimentos consumidos *in natura*: alface, banana, batata, cenoura, laranja, maçã, mamão, morango e tomate. Desde 2002, foram realizadas 561.200 análises de 92 princípios ativos de agrotóxicos em cada uma das amostras coletadas nos 16 estados que integram o programa. Para realizar essas análises, o PARA recebeu um investimento de R\$ 10 milhões durante todo o período

(EMBRAPA, 2008). A tabela 1 apresenta os dados dessas análises que mostram a contaminação de nove culturas no período de 2002 a 2007.

Tabela 1. Porcentagens de amostras contaminadas por agrotóxicos no período de 2002 a 2007 (ANVISA, 2008).

Tabela 1 – Resultados insatisfatórios (%)						
Cultura	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Alface	8,64	6,67	14	46,45	28,68	40,00
Banana	6,53	2,22	3,59	3,65	N	4,32
Batata	22,2	8,65	1,79	0	0	1,36
Cenoura	0	0	19,54	11,3	N	9,93
Laranja	1,41	0	4,91	4,7	0	6,04
Mamão	19,5	37,56	2,5	0	N	17,21
Maçã	4,04	3,67	4,96	3,07	5,33	2,9
Morango	46,03	54,55	39,07	N	37,68	43,62
Tomate	26,1	0	7,36	4,38	2,01	44,72

N = Análises não realizadas

Os números divulgados indicam que a cultura de morango teve o maior índice de irregularidades em 2003 (54,55%). Mas os resultados apontam uma redução de cerca de 20% dos problemas em comparação com os dados de 2007, quando os desvios foram de 43,62% (Ministério da Agricultura, 2007).

O segundo vilão nos dados divulgados pelo PARA é a alface, com 28,68% das análises irregulares em 2006. Ao contrário do morango, a alface vem obtendo índices de desvios crescentes. Na primeira análise, em 2002, apresentou 8,64% de irregularidades, passando a 40% em 2007 (Ministério da Agricultura, 2007).

Já o tomate apresentou redução das irregularidades, de 26,1% em 2002 para 2,01% em 2006, mas voltou a crescer em 2007 (44,72%). A batata e a laranja são as únicas culturas cujas amostras deram resultados satisfatórios em 2006. A maçã, apesar de baixos níveis de irregularidades, manteve praticamente constante estas porcentagens em todo período avaliado (Ministério da Agricultura, 2007).

Os resíduos de agrotóxicos mais encontrados pelo PARA, neste estudo, em amostras de maçã *in natura* foram: azinfós metílico, carbaril, clorpirifós

metílico, clorpirifós, diclorvós, dicofol, dimetoato, ditiocarbamatos, fenitrotiona, folpete, metidationa, e pirimifós metílico.

Não se sabe ainda sobre os efeitos da acumulação de agrotóxicos no organismo humano. No entanto, algumas pesquisas indicaram que a exposição aos agrotóxicos está associada, em curto e em longo prazo, com vários sintomas de saúde, como dificuldades respiratórias, problemas de memória e de pele (CALDAS *et al.*, 2004, ANVISA, 2007), câncer, depressão (CODEX, 2000) entre outros.

Estes estudos levantaram a questão da necessidade de pesquisas cada vez mais rigorosas sobre as conveniências e os riscos para a população do uso de agrotóxicos. Fica evidente a importância e a urgência de expedientes legais e de conscientização cultural mais ampla, que consigam acompanhar de maneira eficaz o uso de agrotóxicos e o consumo de produtos contaminados com os resíduos desses agrotóxicos.

Dentro de todo o contexto, a fim de colaborar e apoiar o crescimento dos programas de monitoramento de agrotóxicos em alimentos, este trabalho realizou a otimização e validação da técnica de Extração Sólido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura (ESL-PBT) em amostras de maçã para os princípios ativos clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina.

1.2. Cultivo da Maçã

O cultivo da macieira (*Malus sp*) é uma atividade recente no Brasil. No início da década de 70, a produção anual de maçãs era cerca de 1.000 toneladas. Com incentivos fiscais e apoio à pesquisa e extensão rural, o Sul do Brasil aumentou a produção de maçãs em quantidade e qualidade, fazendo com que o país passasse de importador a auto-suficiente e com potencial de exportação (Embrapa, 2008).

A produção mundial anual de maçãs é de 42,4 milhões de toneladas, sendo 16,7 milhões de toneladas produzidas pela China, país com maior produção mundial. Uma parte das 16,7 milhões de toneladas/ano produzidas neste país é consumida dentro do próprio país a custo popular, a outra parte é destinada a exportação (IBGE, 2001).

Em 1990, a produção de maçã no Brasil foi de 408 mil toneladas. O ano de 2005 bateu todos os recordes em produção, produzindo cerca de 844 mil toneladas em uma área aproximadas de 36 mil hectares. Santa Catarina é o estado com a maior produção, 504.994 mil toneladas, seguido por Rio Grande do Sul (296.775 mil ton), Paraná (40.275 mil ton) e São Paulo (1.875 mil ton) (IBGE, 2008). Segundo o Ministério da Agricultura, este crescimento visou atender o consumo interno do Brasil e a demanda de países europeus. O alto valor nutritivo da maçã e sua comercialização a um custo popular, são os fatores que mais contribuíram para o aumento do consumo.

Em questões nutricionais, a maçã possui componentes antioxidantes, vitaminas, niacina além de sais minerais, como fósforo e ferro. As vitaminas do Complexo B ajudam a regular o sistema nervoso e o crescimento, auxiliam no combate a queda de cabelo e na redução de problemas de pele e no aparelho digestivo. Fósforo é indicado para prevenir a fadiga mental, no retardo ao envelhecimento precoce e contribui na formação de ossos e dentes. Além disso, apresenta a quercitina, composto fenólico antioxidante capaz de reduzir os níveis de colesterol, evitando a formação de coágulos sanguíneos, que podem provocar acidente vascular cerebral (AVC) (De MELLO, 2006).

A macieira é uma cultura perene, de ciclo longo e sujeita ao ataque de várias pragas e doenças. Dentre as pragas que assolam a produção de maçãs, temos: Carpocapsa (*Cydia pomonella*), Mosca-das-frutas (*Anastrepha fraterculus*), Lagarta-enroladeira-da-folha (*Bonagota cranaodes*), Ácaro vermelho europeu (*Tetranychus evansi*), Cochonilha-australiana também conhecido como Pulgão-branco (*Icerya purchasi*), Mariposa-oriental (*Grapholita molesta*) e o Pulgão-verde-da-macieira (*Aphis pomi*) e o Pulgão lanígero (Ministério da Agricultura, 2008).

O principal inimigo das plantações de maçã é o Ácaro vermelho europeu, um aracnídeo que em número médio a elevado em uma determinada população pode não apenas prejudicar as folhas, mas também causar prejuízos na produção comercial. Isso ocorre, pois os ácaros reduzem o número de cloroplastos e, por conseqüência, a planta não consegue armazenar fotossintetizados para emissão de brotações e flores do ano seguinte. O ataque dos ácaros pode levar à produção de frutos menores e em menor número (Ministério da Agricultura, 2008).

Em função dos ataques de pragas e doenças no cultivo da maçã, muitos tratamentos fitossanitários tornam-se necessários, principalmente a aplicação de agrotóxicos (RAWN *et al.*, 2006). Porém, observa-se que, através do processo de seleção natural, as pragas podem se tornar muito resistentes à ação de um determinado tipo de agrotóxico e, conseqüentemente, os agricultores tendem a aumentar a quantidade do agrotóxico usado intensificando os problemas de saúde anteriormente citados (Embrapa, 2008).

Uma aplicação inadequada de agrotóxicos pode provocar impactos ambientais, como contaminações do solo, águas e dos próprios frutos, alvo dessa pesquisa. Além de provocar desequilíbrio ecológico, por eliminar ou diminuir a eficiência dos inimigos naturais das pragas, podendo resultar em surgimento de novas pragas mais resistentes e persistentes para a cultura (Embrapa, 2008).

1.3. Agrotóxicos

Conforme definição apresentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas, de culturas florestais e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

A análise dos resultados do PARA, obtidos através de estudos realizados entre julho de 2002 a dezembro de 2007 em amostras de maçãs *in natura*, mostrou que os resíduos mais encontrados em 395 amostras analisadas foram: azinfós metílico, carbaril, clorpirifós metílico, clorpirifós, diclorvós, dicofol, dimeoato, ditiocarbamatos, fenitrotiona, folpete, metidationa e pirimifós metílico. Dentre os agrotóxicos citados, carbaril, clorpirifós, dicofol, dimeoato, ditiocarbamatos, fenitrotiona e pirimifós metílico foram encontrados em quantidades expressivas em grande parte das amostras analisadas. Os compostos cujos grupos químicos fazem parte dos ditiocarbamatos foram os mais detectados em amostras de maçãs (ANVISA, 2007; Embrapa, 2007).

Neste estudo, três classes diferentes de agrotóxicos foram analisadas, deltametrina (piretróide), clorpirifós (organofosforado) e thiamethoxam (neonicotinóide). Embora os piretróides e os neonicotinóides não tenham sido encontrados nessas análises, o uso destes produtos é permitido nessa cultura.

1.3.1. Piretróides - Deltametrina

Os piretróides foram descobertos a partir de estudos que procuravam modificar a estrutura química das piretrinas naturais. Uma vez que apresentavam maior capacidade letal para os insetos, maior estabilidade à luz e ao calor e menor volatilidade, despertaram o interesse dos cientistas (Embrapa, 2007).

Foram introduzidos no mercado em 1976 e ainda que sejam mais caros por unidade de peso, comparados aos outros praguicidas, os piretróides assumem importante papel na área da Saúde e na Agricultura (Ministério da Agricultura, 2007). Isto se deve a sua alta eficiência, sendo necessárias menores quantidades de produto ativo, resultando em menor contaminação nas aplicações. Com isso, vêm tomando rapidamente o lugar dos organofosforados. Outra vantagem destes agrotóxicos é que eles admitem a sinergia, ou seja, a potencialização pela adição de um sinergista, aumentando sua eficácia (ANVISA, 2007).

Os piretróides sintéticos têm boa estabilidade sob luz e temperatura ambiente. Degradam-se por hidrólise e oxidação, ou por microrganismos do próprio ambiente em processo acelerado (SUCEN, 2007).

São neurotoxinas que atuam na transmissão dos impulsos nervosos. Segundo SODERLUND *et al.* (2002), o modo de ação desta classe de inseticidas é semelhante ao dos organoclorados ciclodienos. Isto é, atuam na transmissão axônica, interferindo no fluxo normal dos íons sódio envolvidos na transmissão dos impulsos nervosos. Isto torna sua ação repelente, espantando os insetos sem eliminá-los (SUCEN, 2007).

Normalmente, a aplicação dos piretróides é realizada na parte foliar das culturas, mas também podem ser utilizados em produtos ensacados e armazenados (ANVISA, 2006). Dentre os piretróides mais utilizados destaca-se a deltametrina, cuja fórmula estrutural está representada na Figura 1.

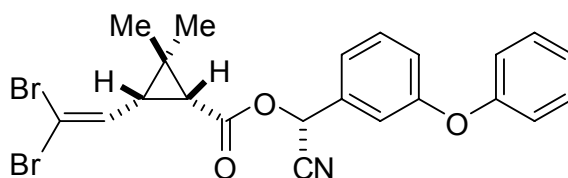


Figura 1. Fórmula estrutural da deltametrina.

A deltametrina, composto de massa molar igual a $505,02 \text{ g mol}^{-1}$, com solubilidade em água de aproximadamente $0,0002 \text{ mg L}^{-1}$ ($20 \text{ }^\circ\text{C}$), apresenta um limite máximo de resíduo (LMR) permitido de $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ para maçã (ANVISA, 2007).

1.3.2. Organofosforados - Clorpirifós

Desenvolvidos na década de 40, foram os primeiros a substituírem os representantes do grupo dos organoclorados, aos quais os insetos já apresentavam resistência. Possuem uma ampla gama de produtos agrícolas e sanitários, desde os extremamente tóxicos até aqueles com baixa toxicidade, como o temephós, que tem seu uso permitido em água potável (SUCEN, 2007). Na área da Saúde são bem usados, dada a sua eficiência. No entanto, o grupo dos organofosforados é responsável por grande número de intoxicações e mortes no país (PENA *et al.*, 2003).

São biodegradáveis, com persistência curta no solo, de 1 a 3 meses. O principal meio de degradação no ambiente passa pela hidrólise sob condições de alcalinidade. É importante que estes compostos sejam estáveis em pH neutro, devido as suas formulações em óleos concentrados, solventes miscíveis em água e grânulos inertes, para aplicação direta ou após dispersão em água (PENA *et al.*, 2003).

O clorpirifós é altamente tóxico (Classe II). Devido à elevada lipossolubilidade que apresenta, é absorvido pelo organismo humano, especialmente pela pele, além de membranas mucosas e pela via respiratória (PENA *et al.*, 2003).

Atuam inibindo a ação da enzima acetilcolinesterase na transmissão dos impulsos nervosos. Estes compostos são conhecidos por induzirem ou agravarem certos problemas de saúde em seres humanos (EPA, 2006; SILVA *et al.*, 2006). Em seu estudo, RUSSO *et al.* (2002), encontrou organofosforados em tecidos

humanos de rins, fígado e tecido adiposo de pacientes saudáveis e afetados por câncer, os quais foram quantificados em níveis de nanogramas de agrotóxicos por grama de tecido.

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

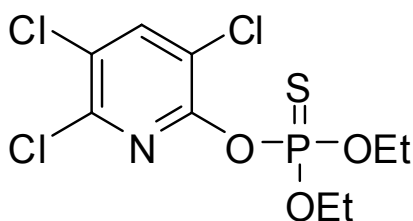


Figura 2. Fórmula estrutural do clorpirifós.

O clorpirifós é um sólido cristalino de massa molar $350,50 \text{ g mol}^{-1}$, com temperatura de fusão de aproximadamente $43 \text{ }^{\circ}\text{C}$, que apresenta baixa solubilidade em água ($1,4 \text{ mg L}^{-1}$ a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$) (NRA, 2000).

A preocupação com a presença de clorpirifós em alimentos tem motivado a realização de vários trabalhos, como por exemplo, o estudo de clorpirifós em casca e polpa de pepino (FERST, 1991), em diversos vegetais (VIANA *et al.*, 1996), tomates (GOBO, 2001), em alface (PENA *et al.*, 2003). Destaca-se o estudo de CELLA (2002) que detectou clorpirifós em maçãs, acima do limite máximo de resíduo permitido para amostras comerciais. De acordo com a ANVISA, o limite máximo de resíduo (LMR) para laranja é de 2 mg kg^{-1} e para maçãs 1 mg kg^{-1} .

1.3.3. Neonicotinóides – Thiamethoxam

Os neonicotinóides são uma classe de inseticidas que tiveram origem na molécula de nicotina. Em 1972, a ação inseticida dos neonicotinóides foi demonstrada a partir de um derivado heterocíclico do nitrometileno. Este trabalho resultou na descoberta da nitiazina, composto que nunca foi comercializado como inseticida, mas que serviu de composto líder para a síntese de todos os neonicotinóides. Em 1990, foi introduzido na Europa e no Japão o primeiro

composto desta classe, o imidaclopride, sendo apenas comercializado nos EUA em 1992. Em 1998, a Novartis® lançou o Thiametoxan, um neonicotinóide com uma estrutura diferente e original e com grande atividade inseticida (Esalq – USP, 2006).

Em recente pesquisa, o professor e coordenador da Esalq, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (USP-Piracicaba), Paulo Roberto de Camargo e Castro, identificou o efeito bioativador do thiamethoxam sobre a soja. Segundo ele, "O bioativador atua na expressão dos genes responsáveis pela síntese e ativação de enzimas metabólicas, relacionadas ao crescimento da planta, alterando a produção de aminoácidos precursores de hormônios vegetais. Com a maior produção de hormônios, a planta apresenta maior vigor, germinação e desenvolvimento de raízes." Além disso, foi observada uma melhora na nutrição mineral da soja, devido ao aumento do transporte iônico e a absorção de minerais (Esalq – USP, 2006).

Estes compostos normalmente são muito pouco tóxicos devido à sua grande seletividade para os receptores nicotínicos dos insetos, mas apresentam alguns problemas para outros seres vivos. Muito deles são tóxicos para as abelhas, o tiaclopride e o thiamethoxam são potenciais carcinogênicos em humanos; a acetamiprida, o imidaclopride e o tiaclopride são mais tóxicos para as aves, enquanto que o tiaclopride é mais tóxico para os peixes (Esalq – USP, 2006). Os neonicotinóides apresentam ação sistêmica, são de classe toxicológica IV (tarja verde) e estão registrados em inúmeros países, inclusive no Brasil, para o controle de insetos-praga sugadores e mastigadores. Em geral são razoavelmente solúveis em água, biodegradáveis e alta seletividade para insetos (EMBRAPA, 2008).

A fórmula estrutural deste composto está representada na figura 3:

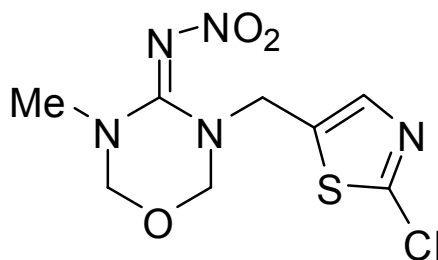


Figura 3. Fórmula estrutural do agrotóxico thiamethoxam.

O thiamethoxam possui o nome químico 3-(2-cloro-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-[1,3,5]oxadiazinan-4-ilideno-N-nitroamina (PESSINI, 2003). Sua massa molar é $291,7 \text{ g mol}^{-1}$ e sua temperatura de fusão de $191,1^\circ\text{C}$. Segundo a ANVISA, o LMR para maçã é de $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$.

1.4. Análises de agrotóxicos

Na agricultura, uma grande quantidade de agroquímicos é usada para eliminar pragas e doenças de frutas e vegetais. São inquestionáveis os benefícios que estes compostos químicos trazem para a produção mundial. Porém, o manejo inadequado permite que resíduos de agrotóxicos persistam nos frutos, solo e lençóis freáticos trazendo risco a saúde dos consumidores devido à toxicidade destes produtos (KRISTENSON, 2006).

Em conseqüência, uma Comissão da União Européia estabeleceu os limites máximos de resíduos (em inglês MRLs) que pode ser encontrado em frutas e vegetais (EU DIR 93/58 EEC de 1993), afim de assegurar que a presença destes insumos agrícolas, não cause riscos a saúde pública (NAVARRO, 2002). Comparado a União Européia, existe a Environmental Protection Agency (EPA) e a Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil. Para atender a estas normas, diversos métodos de análise multiresíduos têm sido desenvolvidos para frutas e vegetais (ALBERO *et al.*, 2003).

As etapas básicas de um método de extração consistem no preparo da amostra, extração do analito de interesse, clean-up e análise do extrato.

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

Existem técnicas mais rápidas e que utilizam menores quantidades de solventes orgânicos como, por exemplo, a Extração com Fluido Supercrítico (LEHOTAY, 1997) e a Extração em Fase Sólida (LANÇAS, 2004; TORRES *et al.*, 1997) e que permitem analisar matrizes com baixa concentração dos analitos, com maior sensibilidade de detecção. Outra técnica muito divulgada em trabalhos científicos é a Extração Sólido-Líquido, mas assim como a extração líquido-

líquido, consome solventes orgânicos e amostra além de co-extrair um grande número de interferentes da matriz (ALBERO *et al.*, 2005).

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

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector ultravioleta é muito útil na quantificação de agrotóxicos não volatilizáveis (VILLAGRASA *et al.*, 2007). Análises espectrofotométricas são mais úteis para quantificação de ditiocarbamatos devido à geração de CS₂ após digestão ácida, entretanto, não especifica o ditiocarbamato analisado (DIAS *et al.*, 2000).

Os extratos obtidos pelas técnicas de extração podem ser analisados por métodos cromatográficos e espectrofotométricos.

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

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

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

GOULART desenvolveu uma metodologia simples e de baixo custo, para análise de deltametrina e cipermetrina em leite. Este método denominado extração líquido-líquido e purificação por precipitação a baixa temperatura, permitiu determinar piretróides em leite por cromatografia gasosa, sem a necessidade de etapas de *clean-up* (GOULART, 2004 e 2008). Posteriormente, esta técnica foi aplicada para extração de piretróides em amostras de água e solo, passando a técnica a ser denominada para essas matrizes de Extração Líquido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura (ELL-PBT) e Extração Sólido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura (ESL-PBT) (VIEIRA *et al.*, 2007). Além das matrizes de solo e água (VIEIRA, 2005; MAGALHÃES, 2007; PAULA, 2007), estas técnicas tiveram bons resultados em amostras de tomate (PINHO, 2007) e batata (DARDENGO, 2007; BITTENCOURT, 2008).

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

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

A acetona também poderia ser empregada para a ESL-PBT, pois é miscível em água, em todas as proporções, além de apresentar menor temperatura de fusão e densidade que a água. Entretanto, a acetona é incompatível com o sistema CG-DCE, sendo então necessária, após a extração dos agrotóxicos, a evaporação da acetona e redissolução dos resíduos em outro solvente. Alguns solventes que poderiam ser empregados na ESL-PBT são apresentados na Tabela 3.

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

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

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

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

1.6. Efeito de matriz

Em 1993, ERNEY e colaboradores, desenvolveram um estudo com matrizes de amostras naturais. Durante a obtenção dos extratos, perceberam a co-extração de componentes da matriz, que influenciaram nas respostas dos agrotóxicos em cada análise. Estes resultados estão relacionados com o efeito de matriz que ocorrem durante as análises cromatográficas (SCHENCK & LEHOTAY, 2000).

KERBALE e TANG em 1993 relataram pela primeira vez o efeito de matriz em cromatografia líquida de alta eficiência. De acordo com Souverian (2004), existem várias técnicas de ionização (ESI, APCI, API, etc.) responsáveis pela

formação de íons sem a fragmentação molecular. O que acontece para matrizes complexas é que os co-extratos competem pela ionização e podem suprimir ou ressaltar a ionização dos analitos ocasionando porcentagens de recuperação errôneas.

Os estudos do efeito de matriz ficaram comprovados quando HAJŠLOVÁ & ZROSTLIKOVÁ (2003) e MENKISSOGLU-SPIROUDI & FOTOPOULOU (2004) analisaram matrizes complexas, em geral de alimentos, para quantificar uma variedade de agrotóxicos presentes nas amostras. Ao final, concluíram que, apesar da eficácia dos métodos cromatográficos em determinações multirresíduos de agrotóxicos, os rendimentos extrapolaram 100% de recuperação. Esses resultados foram atribuídos, em parte à presença de co-extrativos da matriz na extração orgânica.

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

O efeito de matriz pode ocorrer em diversas partes do sistema cromatográfico como: injetor, coluna ou detector. No injetor, as interações entre analitos e os sítios ativos do *liner* (insertor) são as principais responsáveis pelo efeito de matriz nas análises cromatográficas. O *liner* (insertor) situado na porta de injeção, é um tubo de vidro, contendo grupos silanois em sua estrutura. Esses grupos silanois são os sítios ativos que podem induzir a degradação ou simplesmente adsorver o composto de interesse (HAJŠLOVÁ & ZROSTLIKOVÁ, 2003).

Para quantificação dos compostos de interesse, geralmente são preparadas curvas analíticas em solvente puro. Quando estas soluções são injetadas no cromatógrafo a gás, os sítios ativos do insertor (*liner*) estão disponíveis para interagirem com os analitos presentes na solução. Em

contrapartida, em análises de extratos obtidos por método adequado, ocorre uma competição entre os compostos de interesse e os componentes da matriz, que também são extraídos, pelos mesmos sítios ativos do *liner*. Por consequência, uma porção maior do analito será introduzida na coluna cromatográfica, gerando uma resposta maior para o agrotóxico quando comparado com a resposta deste em solvente puro (MENKISSOGLU-SPIROUDI & FOTOPOULOU, 2004).

Dentre os fatores que influenciam no efeito de matriz, está a concentração do analito de interesse no extrato a ser analisado (HAJSLOVÁ *et al.*, 1998). Em 2000, SCHENCK & LEHOTAY observaram o que HAJSLOVÁ *et al.* em 1998 havia publicado. Ao trabalhar com o agrotóxico terbufós, SCHENCK & LEHOTAY notaram que nenhum efeito de matriz era observado quando se trabalhava com altas concentrações do agrotóxico. Entretanto, para baixas concentrações, um pronunciado efeito de matriz foi verificado.

Em sua conclusão, SCHENCK & LEHOTAY afirmaram que para baixas concentrações, a quantidade de agrotóxico que sofre adsorção e/ou degradação no injetor é maior comparada à porcentagem que chega no detector. Ao passo que, para altas concentrações, a perda de analitos no injetor é pequena em relação à porção que atinge o detector, já que a quantidade de agrotóxico presente na amostra é maior. Assim, para as mesmas quantidades retidas no injetor, há influência mais significativa para baixas concentrações.

Além da concentração dos analitos de interesse, outro fator que influencia na intensidade do efeito de matriz, é o tipo de amostra analisada. De acordo com MENKISSOGLU-SPIROUDI & FOTOPOULOU (2004), as matrizes de alimentos, devido à complexidade que possuem, são as que causam maior efeito de matriz. Num estudo feito com tomate, pimenta e pepino, MENKISSOGLU-SPIROUDI & FOTOPOULOU (2004) avaliaram dezoito agrotóxicos, alterando a concentração dos analitos e a matriz de estudo. Notaram que para a deltametrina em tomate, a porcentagem de recuperação foi de 320%, enquanto que na mesma concentração para a deltametrina em pimenta e pepino, houve recuperação de 233% e 153% respectivamente.

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 agrotóxicos. Além disso, o próprio espectrômetro de massa contribui para o aumento da resposta devido à superfície metálica do detector e o fato de não ocorrer combustão neste (SCHENCK & LEHOTAY, 2000).

Além de todos os fatores citados anteriormente que podem influenciar no efeito de matriz, existem as propriedades físico-químicas dos agrotóxicos, que também são fatores relevantes no estudo deste efeito. Segundo MENKISSOGLU-SPIROUDI & FOTOPOULOU (2004), polaridade, volatilidade, estabilidade em altas temperaturas, estabilidade em solvente puro e em extratos da matriz, etc., são fatores que deve ser levados em consideração quando se trata do efeito de matriz.

Agrotóxicos que contém os grupos amidas, sulfonas e/ou ligações P=O, de uma forma geral, compostos mais polares, são largamente afetados pelo efeito de matriz. Ou mesmo compostos de elevada massa molar como os piretróides tendem a apresentar também um aumento da resposta (SANCHEZ-BRUNETE *et al.*, 2005).

Embora o monitoramento efetivo de um grande número de amostras seja possível para uma variedade de agrotóxicos, a obtenção de taxas de recuperação relevantes para todos os analitos é praticamente impossível. Isto se deve à extensa faixa de propriedades físico-químicas e ao efeito de matriz, relativas aos agrotóxicos. São necessários meios para corrigir o efeito de matriz já que é considerado um dos pontos críticos para a validação de um método (MENKISSOGLU-SPIROUDI & FOTOPOULOU, 2004).

Uma alternativa indicada e comumente utilizada para minimizar os erros deste efeito, consiste na adição do padrão da substância em diversas concentrações em uma matriz similar à da amostra, isenta de agrotóxicos, e construção do gráfico de calibração relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões. O método de superposição de matriz, como é chamado, é mais vantajoso sobre o método de padronização externa porque fornece uma melhor correspondência com a composição da amostra. Apesar de se obter uma calibração confiável com o método de superposição de matriz, ele é somente uma forma de compensar efeitos de matriz, mas não elimina situações analíticas típicas: a intensidade de um efeito e a concentração de interferentes na

matriz podem diferir de uma matriz ou amostra para outra (RIBANI *et al.*, 2004). Este método tem o inconveniente de não proporcionar a magnitude do efeito de co-extratos, consumo de tempo e de padrões, uma vez que é necessário preparar uma curva analítica para cada amostra (POOLE, 2007; SCHENCK & LEHOTAY, 2000).

Neste caso, as atenções são voltadas para a possível degradação dos analitos em meio aos extratos da matriz. Porém, segundo KOCOUREK *et al.* (1998), muitos agrotóxicos se mostraram estáveis diante dos extratos, ocorrendo degradação apenas para os organofosforados quando não armazenados a baixa temperatura. Com a armazenagem a baixa temperatura, observou-se estabilidade semelhante às das soluções preparadas em solvente puro (SCHENCK & LEHOTAY, 2000).

Outro caminho para reduzir o efeito de matriz é a injeção *on-column*. Consiste em injetar o extrato diretamente na coluna, evitando assim a etapa de contato dos analitos com os sítios ativos do *liner* do injetor. Porém, este processo pode danificar a coluna sendo necessário eliminar pequenos pedaços da extremidade que perderam fase estacionária (sangria). Frequentes trocas do *liner* do injetor pode ser uma solução, mas torna-se dispendioso a cada troca (SCHENCK & LEHOTAY, 2000).

Outra forma seria introduzir no método, etapas de *clean-up* para reduzir os co-extrativos. Uma desvantagens do *clean-up*, é a retirada não só dos co-extrativos, que causam o efeito de matriz, mas também dos agrotóxicos de interesse, refletindo em porcentagens de recuperação menores (POOLE, 2007; SCHENCK & LEHOTAY, 2000).

Em 2005, dois estudos (SANCHEZ-BRUNETE *et al.*, 2005; MASTOVSKA *et al.*, 2005) propuseram métodos satisfatórios para eliminar o efeito de matriz. O objetivo dos pesquisadores foi mascarar os sítios ativos do injetor com a inserção de substâncias químicas, chamadas de protetores de analito, nas soluções preparadas para os padrões em solvente puro, impedindo assim, a adsorção e/ou degradação dos agrotóxicos. Tais substâncias protetoras como o óleo de oliva (ou produtos de degradação destes) têm maior capacidade de fazer ligações de hidrogênio com os grupos silanóis do *liner* de injeção, quando comparadas com os agrotóxicos. Com isso, é possível ocupar os sítios ativos do injetor como fazem

os co-extratos da matriz e permitir a passagem em maior quantidade dos agrotóxicos para a coluna (MASTOVSKA *et al.*, 2005).

1.7. OBJETIVOS

1.7.1. Objetivos Gerais

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

1.7.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer as condições de análise da clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina por cromatografia gasosa.
- Otimizar a análise de multirresíduo em amostras de maçã fortificadas, empregando a Técnica de Extração Sólido – Líquido e Partição à Baixa Temperatura (ESL-PBT).
- Validar a metodologia otimizada para determinação dos agrotóxicos clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina em maçã.
- Avaliar o comportamento de diferentes curvas padrão na redução do efeito de matriz em cromatografia gasosa.
- Empregar a metodologia otimizada para a extração e quantificação dos multirresíduo em amostras de maçã obtidas no comércio de Viçosa

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparo de soluções padrão de agrotóxicos

As soluções empregadas neste trabalho foram preparadas pela solubilização de padrões dos agrotóxicos clorpirifós (99,0% m/m - Chem Service), thiamethoxam (97,0% (m/m) – Syngenta) e deltametrina (99,0% m/m - Chem Service), em acetonitrila (Mallickrodt / HPLC). Soluções estoque de 1000,0 mg L⁻¹ foram preparadas para cada padrão e armazenadas em freezer. A partir da diluição das soluções estoque, foi preparada uma solução de trabalho contendo os agrotóxicos clorpirifós e deltametrina em concentrações de 10,0 mg L⁻¹, e uma solução de trabalho contendo thiamethoxam na concentração de 50,0 mg L⁻¹, em acetonitrila.

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

2.2. Preparo de amostras de maçãs fortificadas

Amostras de maçã (5 lotes contendo 3 unidades cada), adquiridas no comércio de Viçosa, foram lavadas e trituradas em um multiprocessador. Três gramas (3,0000 g) da polpa obtida foram fortificadas com 100,0 µL da solução preparada com clorpirifós e deltametrina de concentração igual a 10,0 mg L⁻¹ e com 100,0 µL da solução contendo thiamethoxam de concentração 50,0 mg L⁻¹. As amostras fortificadas foram deixadas por aproximadamente duas horas em frasco aberto para evaporação do solvente.

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

Os ensaios para otimização da técnica de extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura para análise dos agrotóxicos clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina em amostras de maçã foram adaptados da técnica descrita para a extração de deltametrina e cipermetrina em leite (GOULART et al, 2008) e para extração de quatro piretróides em água e solo (VIEIRA, 2005; VIEIRA et al, 2007).

O método consistiu em adicionar 8,0 mL de uma mistura extratora e 1,0 mL de água a 3,0000 g de amostra previamente fortificada, contida em frascos plásticos opacos de 25,0 mL. Posteriormente a mistura foi homogeneizada e resfriada em freezer a -20 °C por aproximadamente 8 horas. Após a separação das fases pelo congelamento da fase aquosa e da polpa de maçã, o extrato sobrenadante foi recuperado em balão volumétrico de 10,0 mL e o volume completado com acetonitrila e transferido para frasco de armazenagem de 10,0 mL, até o momento da análise.

As concentrações dos analitos no extrato foram determinadas por cromatografia gasosa, usando detector por captura de elétrons (DCE).

2.3.1. Planejamento Fatorial 2³

Um planejamento fatorial 2³ foi executado para estudar o comportamento simultâneo de três fatores: (1) Agitação da amostra, (2) força iônica e (3), proporção de solvente extrator acetonitrila:acetato de etila (ACT:ACE) na eficiência de extração dos agrotóxicos na maçã. Cada uma destas variáveis foi avaliada em dois níveis (-1 e +1), conforme representado na Tabela 2.

Tabela 2. Fatores codificados e originais avaliados na otimização da técnica de ESL-PBT.

Ensaio	Fatores Codificados			Fatores Originais		
	F(1)	F(2)	F(3)	(1) Agitação (min) [mecânica (M) e ultra-som (US)]	(2) Força Iônica (mol.L ⁻¹) NaH ₂ PO ₄	(3) Proporção ACT:ACE (mL)
1 e 2	-	-	-	10 (US)	0,0	7,80 : 0,20
3 e 4	+	-	-	30 (M)	0,0	7,80 : 0,20
5 e 6	-	+	-	10 (US)	0,2	7,80 : 0,20
7 e 8	+	+	-	30 (M)	0,2	7,80 : 0,20
9 e 10	-	-	+	10 (US)	0,0	6,50 : 1,50
11 e 12	+	-	+	30 (M)	0,0	6,50 : 1,50
13 e 14	-	+	+	10 (US)	0,2	6,50 : 1,50
15 e 16	+	+	+	30 (M)	0,2	6,50 : 1,50

Os experimentos (oito) foram realizados adicionando a cada porção de amostra (3,0000 g de maçã fortificada), contidas em frascos plásticos opacos com tampa, a água e a mistura extratora. As quantidades das variáveis codificadas F1, F2 e F3 em seus níveis (-) e (+) estão presentes na tabela 2.

Após agitação, as amostras foram mantidas em freezer a -20 °C por aproximadamente 8 horas. Os volumes dos extratos foram ajustados para 10,0 mL em balão volumétrico e transferido para frasco de armazenagem até o momento da análise cromatográfica.

2.3.2. Etapa de *clean up*

No intuito de melhorar a qualidade dos cromatogramas, os extratos orgânicos obtidos da ESL-PBT de amostras de maçã foram submetidos a uma etapa de *clean up*. Depois de resfriada a -20 °C, a fase orgânica líquida foi eluída por uma coluna (10,0 cm de comprimento x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 2,0000 g de adsorvente (florisil ou octadecil C-18) e 1,500 g de sulfato de sódio anidro. Foi utilizado como eluente uma mistura de solventes acetonitrila:acetato de etila (6,5:1,5). A recuperação dos extratos foi feita em balões volumétricos de

10,0 mL e armazenados em frascos de vidro até o momento da análise cromatográfica.

2.3.3. Método otimizado da ESL-PBT e análise por cromatografia gasosa de três agrotóxicos em maçã.

Amostras de maçã com casca devidamente trituradas (3,0000 g), foram fortificadas com 100,0 μ L de solução contendo clorpirifós e deltametrina a 10,0 mg/L e 100,0 μ L de uma solução com thiamethoxam a 50,0 mg/L, e deixadas por aproximadamente duas horas em frasco aberto para evaporação do solvente.

Em seguida, foram adicionados 8,0 mL da mistura extratora (6,5 mL de acetonitrila e 1,5 mL de acetato de etila) e 1,0 mL de solução de NaH_2PO_4 à 0,2 mol L^{-1} . Esta mistura permaneceu por 30 minutos em mesa agitadora a 180 oscilações por minuto (opm). Na fase de congelamento no freezer à temperatura de $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 8 horas foram necessárias para que a fase aquosa juntamente com a polpa congelasse, enquanto o solvente orgânico contendo os analitos de interesse, continuasse na fase líquida.

O sobrenadante orgânico foi eluído com uma mistura de solventes (6,5 mL de acetonitrila e 1,5 mL de acetato de etila), por uma coluna (10,0 cm de comprimento x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 2,0000 g de florisil e 1,5000 g de sulfato de sódio anidro. Os extratos finais foram recolhidos em balões volumétricos de 10,0 mL e armazenados em frascos de vidro até o momento da análise cromatográfica.

2.4. Análise Cromatográfica

As análises dos extratos orgânicos e soluções dos padrões foram feitas em um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17 A, equipado com um por captura de elétrons (DCE).

A quantificação dos compostos nos cromatogramas foi feita pela comparação dos tempos de retenção dos analitos nos extratos das amostras com os tempos de retenção dos padrões clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina.

A coluna utilizada e as condições analíticas estabelecidas para as análises dos 3 agrotóxicos estão descritas a seguir:

- Coluna capilar Agilent Technologies HP-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 $\xrightarrow{10\text{ °C/min}}$ 290 °C (1 min) Tempo total de análise: 10 minutos
- Temperatura do injetor: 280 °C
- Temperatura do detector (DCE ou DIC): 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

A quantificação dos três princípios ativos nos extratos das amostras de maçã, foi feita comparando-se a razão das áreas do analito pelas áreas do padrão interno com a razão das áreas obtidas da análise cromatográfica de soluções padrões dos princípios ativos em acetonitrila.

Partindo da solução de trabalho, para clorpirifós e deltametrina foram preparadas soluções padrão nas concentrações de 5,0; 25,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0 e 300,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para o thiamethoxam, foram preparadas soluções nas concentrações de 25,0; 50,0; 100,0; 200,0; 250,0; 300,0; 400,0 e 500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

As análises foram feitas em um cromatógrafo a gás com detector por captura de elétrons nas condições analíticas pré-estabelecidas. Após análise dessas

soluções, curvas analíticas foram construídas, para cada princípio ativo, correlacionando, a razão entre as áreas do padrão e as áreas do padrão interno, com a concentração (variável) do agrotóxico. Por regressões lineares foram obtidas as equações das retas, as quais foram utilizadas no cálculo das concentrações dos agrotóxicos nos extratos das amostras.

2.5. Validação do método analítico

Conforme proposto por RIBANI et al (2004), deve-se assegurar a credibilidade do método analítico desenvolvido submetendo-o a uma validação. Neste trabalho, para a validação do método de extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura e análise por CG-DCE, foram avaliados as seguintes figuras de mérito:

2.5.1. Seletividade

A seletividade foi avaliada comparando-se os cromatogramas dos extratos de amostras de maçã isentas dos agrotóxicos de interesse, com cromatogramas dos extratos da amostra de maçã fortificadas, preparados conforme o procedimento otimizado.

2.5.2. Faixa de Trabalho

A faixa de trabalho foi verificada pelas curvas analíticas dos agrotóxicos clorpirifós e deltametrina nas concentrações de 5,0 a 300,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para o agrotóxico thiamethoxam, as concentrações foram 25,0 a 500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Todas as soluções foram preparadas em acetonitrila. Após a análise cromatográfica, foi construída uma curva analítica, relacionando a razão entre as áreas do analito e as áreas do padrão interno, com as concentrações dos analitos. A faixa de trabalho foi avaliada pelo coeficiente de correlação determinado pela regressão linear.

2.5.3. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) do aparelho e método

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. Já o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al*, 2004).

Os limites de detecção e quantificação foram determinados pelo método da relação sinal-ruído. Foram realizadas injeções dos extratos, de matrizes fortificadas com 100,0 µL de soluções de concentrações 25,0; 20,0; 15,0; 10,0; 5,0; 2,5 e 1,0 mg L⁻¹ para os agrotóxicos clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina. A concentração que proporcionou um sinal três vezes maior que o ruído foi estabelecido como sendo o limite de detecção e um sinal dez vezes maior que o ruído, o limite de quantificação (COLLINS *et al*, 2006).

2.5.4. Precisão

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

2.5.4.1. Repetitividade

A avaliação da repetitividade do método de extração, foi desenvolvida em conformidade com o INMETRO. Amostras de maçã (oito) foram fortificadas com 100,0 µL de uma solução de concentração 10,0 mg L⁻¹ para o clorpirifós e deltametrina, e concentração 50,0 mg L⁻¹ para o thiamethoxam.

Para avaliar a precisão intermediária, foram realizadas oito extrações nas mesmas condições preparadas para o estudo da repetitividade, utilizando os mesmos equipamentos, pelo mesmo analista e no mesmo laboratório, modificando apenas os dias de extração e análise. Após o primeiro dia, o procedimento foi repetido sete dias e 30 dias depois.

2.5.4.2. Exatidão

Entre as maneiras de avaliar a exatidão de um método pode-se recorrer aos ensaios de recuperação (RIBANI, 2004).

Os ensaios de recuperação consistiram em fortificar amostras de maçã com soluções de concentração 1, 2 e 10 vezes maiores do que as concentrações dos limites de quantificação respectivo a cada principio ativo.

Cada amostra de maçã foi fortificada com 100,0 μL de soluções de concentração 0,05; 0,10 e 0,50 mg L^{-1} para o clorpirifós, 0,15; 0,30 e 1,5 mg L^{-1} para o thiamethoxam e 0,20; 0,40 e 2,0 mg L^{-1} para a deltametrina.

Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa nas condições ótimas estabelecidas.

2.6. Avaliação do efeito de matriz na quantificação dos agrotóxicos por cromatografia gasosa

Para avaliar o efeito de matriz na quantificação de amostras de maçã, fortificadas com os princípios ativos clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina, por cromatografia gasosa foram feitos quatro estudos. Extratos de amostras de maçã, fortificadas com 100,0 μL de soluções de concentrações iguais a 0,25; 0,50 e 1,0 mg L^{-1} para os três princípios ativos, foram analisados por cromatografia gasosa. Os resultados dos cromatogramas obtidos foram comparados com os dados dos cromatogramas das curvas padrões dos mesmos agrotóxicos preparadas de maneiras diferentes como descrito a seguir.

2.6.1. Curva analítica preparada em solvente puro

Em balões volumétricos de 10,0 mL, foram adicionados 100,0 μL de soluções de concentrações 0,05; 0,25; 0,50; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg L^{-1} para os agrotóxicos clorpirifós e deltametrina, e 0,25; 0,50; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L^{-1} para o thiamethoxam. O volume foi completado com acetonitrila.

2.6.2. Curva analítica preparada em extratos de amostras isentas de agrotóxicos

O primeiro passo foi produzir 100,0 mL de extrato de amostra de maçã isentas de agrotóxicos (branco).

Em oito balões volumétricos de 10,0 mL, foram adicionados 100,0 μL de soluções de concentração 0,05; 0,25; 0,50; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg L^{-1} para os agrotóxicos clorpirifós e deltametrina, e concentração 0,25; 0,50; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L^{-1} para o thiamethoxam. O volume foi completado para 10,0 mL com o extrato de amostra de maçã obtido sem agrotóxicos.

2.6.3. Curva analítica após saturação do sistema

Em balões volumétricos de 10,0 mL, foram adicionados 100,0 μL de soluções de concentrações 0,05; 0,25; 0,50; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg L^{-1} para os agrotóxicos clorpirifós e deltametrina, e 0,25; 0,50; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L^{-1} para o thiamethoxam. O volume foi completado com acetonitrila.

Antes de cada injeção das soluções padrões no sistema cromatográfico, foram realizadas 3 injeções consecutivas do extrato de maçã isenta de agrotóxicos (item 2.6.2).

Neste procedimento, foi esperado que os componentes da matriz no extrato interagissem com os sítios ativos do *liner*, impedindo a interação dos agrotóxicos presentes nas soluções padrão, quando fossem injetadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise cromatográfica

A cromatografia compreende um grupo diversificado e importante de métodos que permitem separar os componentes de misturas complexas (SKOOG, 2002). Na cromatografia gasosa, a identificação dos compostos de interesse geralmente é realizada comparando-se o tempo de retenção do composto da amostra com o de um padrão (COLLINS *et al.*, 2006). Esta técnica foi utilizada neste trabalho para separação e identificação dos agrotóxicos estudados.

Na Figura 4, está representado um cromatograma de uma solução padrão contendo os agrotóxicos clorpirifós e deltametrina, a $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$, e thiamethoxam a $500,0 \mu\text{g L}^{-1}$. A análise dos padrões foi realizada utilizando-se as condições analíticas descritas no item 2.4.

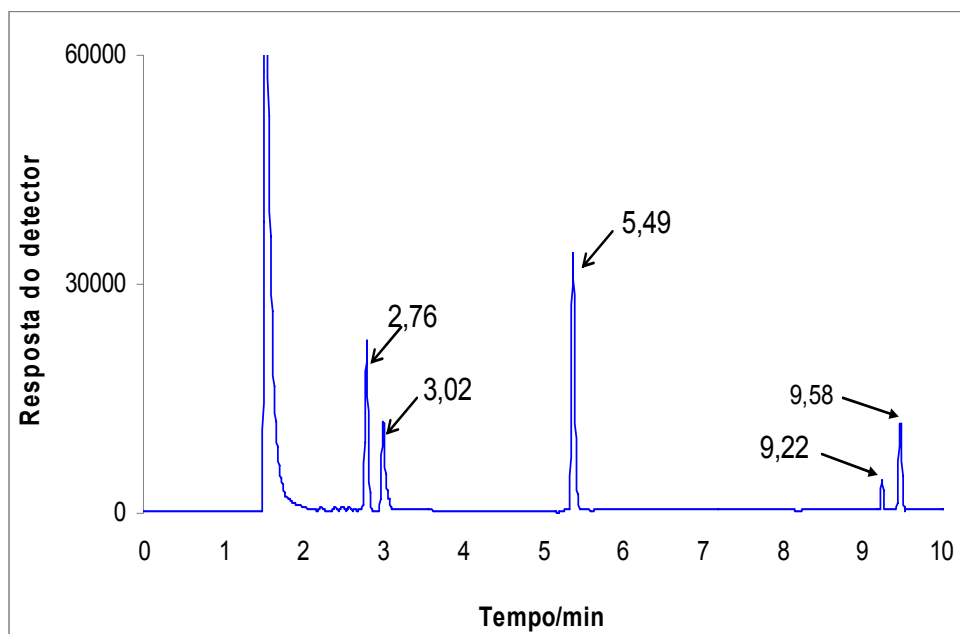


Figura 4. Cromatograma de uma solução padrão contendo os agrotóxicos clorpirifós ($100,0 \mu\text{g L}^{-1}$), thiamethoxam ($500,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e deltametrina ($100,0 \mu\text{g L}^{-1}$), e os tempos de retenção: $t_R = 2,76$ min. para clorpirifós; $t_R = 3,02$ min. para thiamethoxam; $t_R = 5,49$ min. para bifentrina (padrão interno) e $t_R = 9,22$ e $9,58$ min para deltametrina.

Os picos com t_R iguais a: 2,76, 3,02, 5,49, 9,22 e 9,58 minutos correspondem a clorpirifós, thiamethoxam, bifentrina (padrão interno) e deltametrina, respectivamente. No tempo de 9,22 e 9,58 minutos, a deltametrina

se apresenta com dois picos no cromatograma, referentes aos estereoisômeros da deltametrina.

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

A determinação de agrotóxicos em baixas concentrações envolve uma ou mais etapas de preparação da amostra utilizando diferentes técnicas de extração, que visam isolar os analitos de interesse (MORAIS, 2007).

Na extração de resíduos de agrotóxicos em amostras complexas, a extração em fase única com a partição induzida pelo abaixamento de temperatura, se mostrou eficiente para matrizes de leite (GOULART, 2004), água (VIEIRA, 2007), batata (DARDENGO, 2007; BITTENCOURT, 2008) e tomate (PINHO, 2007).

Nestes estudos foi observado que alguns parâmetros, tais como, proporção de solvente extrator, tempo de agitação, a relação massa de amostra/concentração do analito e força iônica, influenciavam na porcentagem de recuperação dos analitos. A otimização a técnica ESL-PBT para determinação de agrotóxicos em maçã, visou avaliar estes parâmetros.

3.2.1. - Planejamento Fatorial 2³

O planejamento fatorial é uma importante ferramenta estatística e, devido a sua simplicidade, vem sendo cada vez mais utilizada pelos químicos analíticos para diferentes amostras e propósitos, pois possibilita a interpretação dos resultados considerando todos os parâmetros experimentais envolvidos, além de fornecer o efeito das possíveis interações entre as variáveis selecionadas (COSTA *et al.*, 2006).

No planejamento fatorial 2³ realizado, foi possível avaliar o comportamento simultâneo de três fatores: (1) Agitação da amostra (30 min. de agitação mecânica ou 10 min. de agitação em banho ultra-sônico), (2) força iônica e (3), proporção de solvente extrator acetonitrila:acetato de etila.

Os ensaios, realizados em duplicata, geraram 16 respostas que permitiram calcular as porcentagens de recuperação média dos agrotóxicos em amostras de maçã fortificada.

Tabela 7. Porcentagens de recuperação e os respectivos coeficientes de variação relativos aos ensaios realizados no planejamento fatorial.

Amostras	Clorpirifós		Thiamethoxam		Deltametrina	
	%R	%CV	%R	%CV	%R	%CV
1 e 2	81,65	14,05	72,73	20,39	85,92	16,84
3 e 4	59,82	36,95	65,40	34,41	77,26	45,75
5 e 6	78,74	4,78	74,01	11,44	79,94	24,02
7 e 8	82,75	21,98	80,19	23,06	83,98	19,53
9 e 10	57,35	19,38	62,97	18,24	72,76	20,15
11 e 12	68,41	23,17	64,23	22,19	80,06	30,54
13 e 14	81,65	3,66	80,32	0,717	89,65	10,51
15 e 16	105,84	3,37	86,47	2,59	100,99	0,71

N = 2

Na tabela 7, encontram-se destacados os ensaios que obtiveram as melhores porcentagens de recuperação para os três agrotóxicos analisados em amostras de maçã.

Os efeitos de cada variável e as interações entre as variáveis na extração dos agrotóxicos, utilizando o programa estatístico Statistica 6.0[®] (StatSoft) seguem na tabela 8.

Tabela 8. Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (\pm estimativa do erro experimental) para os agrotóxicos clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina em maçã.

	CLORPIRIFÓS		THIAMETHOXAM		DELTAMETRINA	
	%R	%CV	%R	%CV	%R	%CV
Recuperação média	88,28	3,08	73,10	3,14	85,09	3,03
	Efeito	%CV	Efeito	%CV	Efeito	%CV
(1) Agitação	6,86	6,16	1,19	6,28	5,97	6,07
(2) Força Iônica	22,94*	6,16*	13,55	6,28	9,67	6,07
(3) Proporção do solvente	5,08	6,16	0,79	6,28	-0,94	6,07
(1) e (2)	12,24	6,16	4,23	6,28	-0,85	6,07
(1) e (3)	15,77*	6,16*	2,51	6,28	5,85	6,07
(2) e (3)	12,93	6,16	6,26	6,28	11,73	6,07

* Efeitos significativos; N = 2

A análise estatística dos resultados da tabela 8 demonstra que o aumento da força iônica e a interação positiva entre os fatores 1 e 3 (agitação e proporção do solvente), causam efeito significativo na porcentagem de recuperação do clorpirifós.

Embora os fatores nos níveis avaliados, não tenham causado efeito significativo nas porcentagens de recuperação dos outros princípios ativos, observa-se uma tendência dos níveis. Na Tabela 8, os níveis positivos (+) favoreceram um aumento na porcentagem de recuperação de todos os agrotóxicos em maçã, isto é, proporção de solvente acetonitrila:acetato de etila 6,5:1,5 (mL), presença ou ausência de hidrogeno fosfato e tempo de agitação de 30 minutos.

O aumento da força iônica, em geral, provoca a redução da solubilidade do analito na matriz, facilitando a sua extração. A diminuição da polaridade do solvente extrator favoreceu a extração dos três princípios ativos em amostras de maçã.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por BITTENCOURT (2008), onde foi observado que a diminuição da polaridade do solvente extrator favoreceu a extração dos agrotóxicos clorpirifós e thiamethoxam em amostras de batata e solo.

Em estudo mais detalhado, PINHO (2007) avaliou diferentes proporções entre solvente polar (acetonitrila) e um solvente menos polar (acetato de etila)

para amostras de tomate. Foi observado que a diminuição da polaridade do solvente favoreceu a extração dos princípios ativos clorpirifós, cialotrina, cipermetrina e deltametrina.

Nos estudos realizados, percebeu-se que, mesmo para matrizes diferentes, o clorpirifós é o menos afetado com a alteração da polaridade do solvente extrator. Tal fato se explica pela maior solubilidade do clorpirifós em água (1,4 mg L⁻¹) em relação aos piretróides e neonicotinóides.

Apesar dos resultados obtidos, para melhorar a eficiência das análises uma etapa de *clean-up* foi incluída no processo de ESL-PBT dos princípios ativos clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina para amostras de maçã.

3.2.2. Eficiência da etapa de clean-up dos extratos obtidos na ESL-PBT de amostras de maçãs

O extrato obtido na etapa de preparo de amostra contém além dos analitos de interesse, componentes da amostra, chamados de co-extrativos.

Quando os extratos são injetados no cromatógrafo, é no *liner* de injeção que os componentes do extrato são volatilizados. Por ser de vidro, o *liner* possui grupos silanóis em sua superfície, que podem interagir com todos os componentes da amostra durante a volatilização do extrato. Esta interação acarreta para alguns casos, a degradação de suas moléculas ou indução a este processo (ERNEY *et al.*, 1993).

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

Estudos iniciais (HAJSLOVA *et al.*, 1998) que avaliaram a etapa de *clean-up*, levaram a concluir que esta pode beneficiar as análises reduzindo ou eliminando os co-extrativos presentes na amostra. Segundo SCHENCK & LEHOTAY (2000), um *clean-up* extensivo para matrizes vegetais, combinando-se carvão ativo e cartuchos de troca iônica, é útil na remoção de pigmentos provenientes da matriz. Como desvantagem, o uso do *clean-up* pode retirar do

extrato, além dos interferentes da amostra, analitos de interesse prejudicando os resultados das análises.

Os extratos de maçã obtidos pela ESL-PBT, numa primeira avaliação visual, não se mostravam impuros. Eram límpidos e transparentes, mas a qualidade dos cromatogramas era afetada pela presença de co-extrativos.

O desenvolvimento dessa etapa se fez necessário, para minimizar as impurezas dos extratos e assim evitar complicações e danos, tanto para as análises quanto para o aparelho. Na figura 8 está representado um cromatograma de extrato de amostras de maçã pelo processo de ESL-PBT. Observa-se a presença de alguns componentes da amostra, que podem interferir na análise dos princípios ativos para amostras que contenha agrotóxicos.

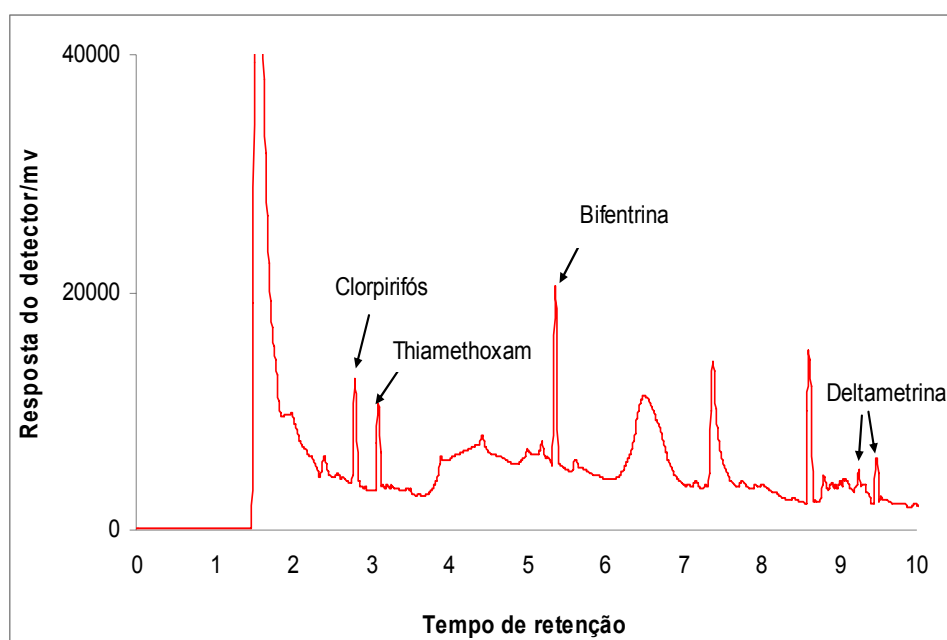


Figura 8. Cromatograma do extrato de amostras de maçã fortificadas com os agrotóxicos clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina, utilizando bifentrina como padrão interno, sem etapa de *clean-up*.

Avaliou-se o *clean-up* pelo uso dos adsorventes florisil e octadecil (C-18), como descrito no item 2.3.2, com o objetivo de eliminar os interferentes dos extratos sem alterar significativamente a recuperação dos agrotóxicos.

Um estudo semelhante foi desenvolvido por PINHO (2007) quando testou florisil, sílica, octadecil (C-18) e carvão ativado para amostras de tomate usando a

ESL-PBT. Apesar de proporcionar extratos incolores, o carvão ativado reduziu em aproximadamente 50% as porcentagens de extração de todos os agrotóxicos. Segundo SOJO *et al* (1997), devido ao seu alto poder adsortivo, o carvão ativo não só interage com os co-extrativos, mas também tem grande afinidade pelos princípios ativos, reduzindo significativamente as taxas de recuperação.

Neste estudo, somente o florisil eliminou a maior parte dos interferentes vistos nos cromatogramas. As porcentagens de recuperação e os respectivos coeficientes de variação são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Porcentagens de recuperação (%R) e respectivos coeficientes de variação (%CV) para os agrotóxicos clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina em amostras de maçã após a etapa de *clean-up*.

Clorpirifós		Thiamethoxam		Deltametrina	
%R	%CV	%R	%CV	%R	%CV
89,1	2,12	74,5	4,81	85,3	4,20

O cromatograma obtido evidencia a melhora nas análises com o uso da coluna contendo florisil e sulfato de sódio anidro. A Figura 9 mostra o cromatograma das amostras de maçã depois da etapa de *clean-up*.

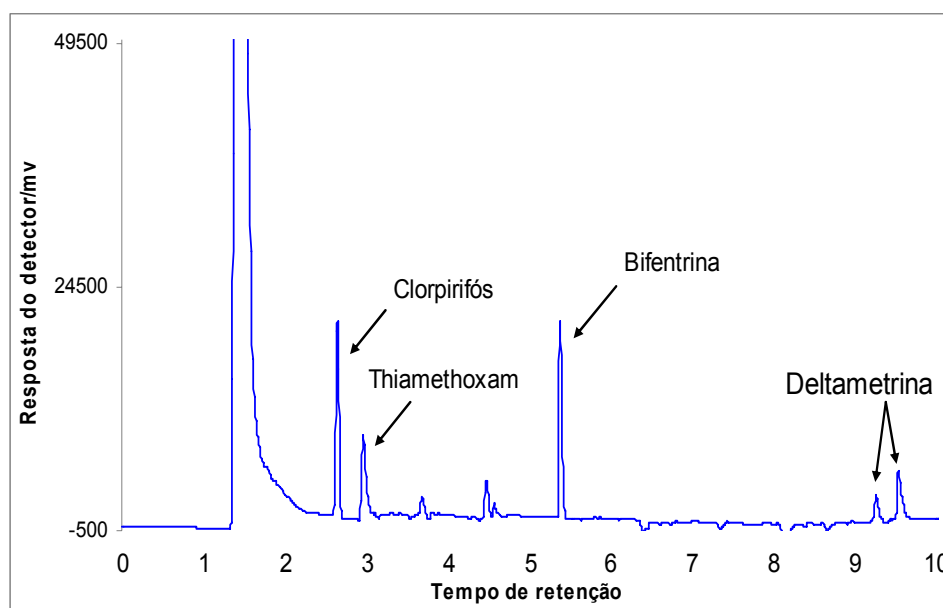


Figura 9. Cromatograma de amostras de maçã fortificada após a etapa de *clean-up*.

Ao contrário do florisil, o adsorvente octadecil (C-18), além de reduzir drasticamente a porcentagem de recuperação do agrotóxico deltametrina, permitiu a passagem de grande quantidade de co-extrativos polares, já que este adsorvente possui caráter apolar. Neste caso, os picos dos interferentes coincidiram com os tempos de retenção dos picos dos analitos, prejudicando a análise dos cromatogramas, bem como a quantificação dos analitos de interesse.

Portanto, a etapa de *clean-up* utilizando 2,0000 g de florisil como adsorvente e 1,5000 g de sulfato de sódio anidro, usado para eliminar o excesso de água, foi incluída no processo de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura para os agrotóxicos clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina para amostras de maçã.

3.3. Metodologia otimizada para extração de clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina em maçã

A metodologia otimizada para a análise dos princípios ativos estudados em amostras de maçã, pela técnica ESL-PBT, foi: 3,0000 g de polpa de maçã, com 1,0 mL de solução de NaH_2PO_4 à $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, 6,5 mL de acetonitrila e 1,5 mL de acetato de etila seguida de agitação mecânica por 30 minutos a 180 opm.

Em seguida, as amostras foram colocadas em um freezer, diretamente no congelador em contato direto com a superfície do gelo, por aproximadamente 8 horas. Decorrido esse período, os extratos foram passados por um cartucho contendo 2,0000 g de florisil e 1,5000 g de sulfato de sódio anidro. Os extratos obtidos foram recuperados em balões volumétricos de 10,0 mL, aferidos com acetonitrila e transferidos para frascos de vidro com tampa até o momento da análise por cromatografia gasosa.

3.4. Validação do método analítico

Validação do método analítico é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. A validação de métodos desenvolvidos no laboratório é efetuada após seleção, desenvolvimento e otimização dos métodos (BARROS, 2002).

Em análise de resíduos de agrotóxicos a validação do método ocorre, usualmente, por meio de ensaios de recuperação, uma vez que este processo gera todas as informações necessárias para a avaliação do procedimento analítico.

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

3.4.1. Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como compostos de propriedades similares, que porventura, estejam presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI *et al.*, 2004).

Este parâmetro foi avaliado comparando-se o cromatograma obtido após extração da matriz de maçã isenta dos agrotóxicos clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina com o cromatograma do extrato de matriz de maçã fortificada e analisada conforme o procedimento otimizado descrito no item 2.3.3.

O cromatograma apresentado na Figura 10A apresenta alguns picos referentes aos componentes da matriz. Entretanto, na Figura 10B observa-se que não há interferentes nos mesmos tempos de retenção dos compostos analisados o que torna a metodologia seletiva.

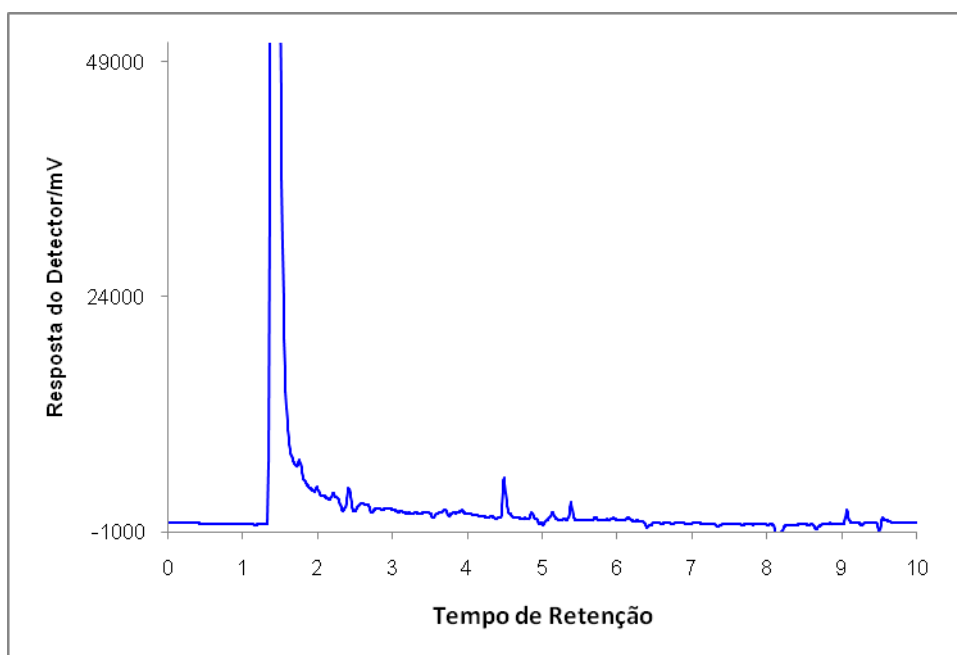
Esta seletividade, também é relativa à seletividade do detector empregado para análise dos extratos de maçã. O detector por captura de elétrons, utilizado neste estudo, apresenta boa seletividade para compostos orgânicos halogenados, aldeídos conjugados, nitrilas, nitratos e organometálicos. Porém, é praticamente insensível a hidrocarbonetos, alcoóis e cetonas (COLLINS *et al.*, 2006). Isto favorece a obtenção de melhores respostas do detector frente as análises de matrizes complexas, como é caso da maçã.

3.4.2. Linearidade da resposta do detector

A linearidade é a resposta obtida em função da concentração do analito, a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado (RIBANI, 2004).

Por meio de curvas analíticas dos padrões, preparadas conforme descrito no item 2.5.2, foi possível verificar a linearidade de resposta do detector. Nas Figuras 15 e 16 estão representadas as curvas analíticas quando soluções padrão foram analisadas por CG-DCE. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação determinado pela regressão linear.

A)



B)

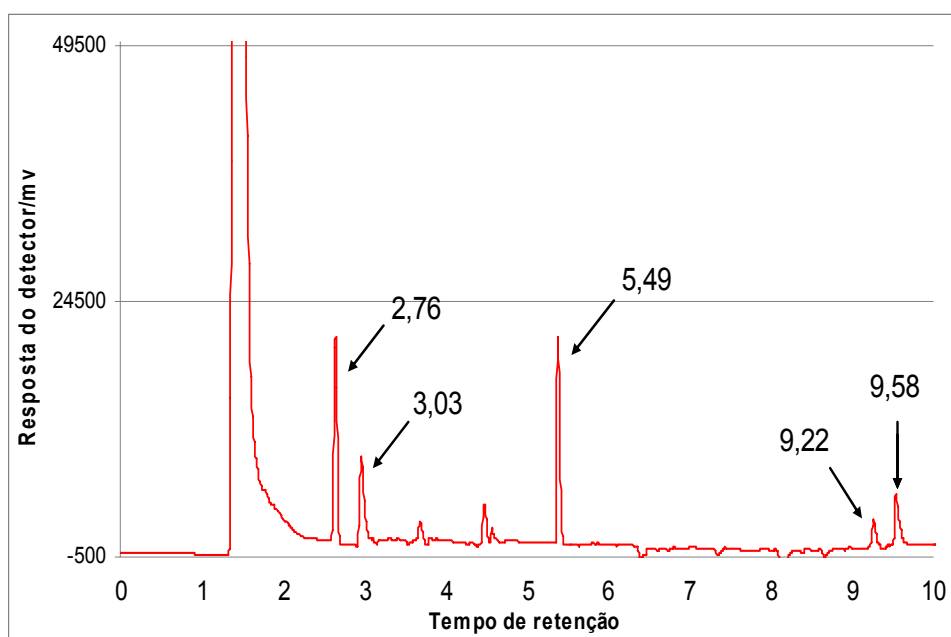


Figura 10. A) Cromatograma do extrato obtido da matriz isenta dos agrotóxicos e B) Cromatograma da amostra fortificada com $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$ dos agrotóxicos Clorpirifós ($t_R = 2,76 \text{ min}$) e deltametrina ($t_R = 9,22 \text{ e } 9,58 \text{ min}$), $500,0 \mu\text{g L}^{-1}$ do princípio ativo thiamethoxam ($t_R = 3,03 \text{ min}$) e $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ do padrão interno ($t_R = 5,49 \text{ min}$). Os extratos analisados foram obtidos a partir da metodologia otimizada (item 3.3).

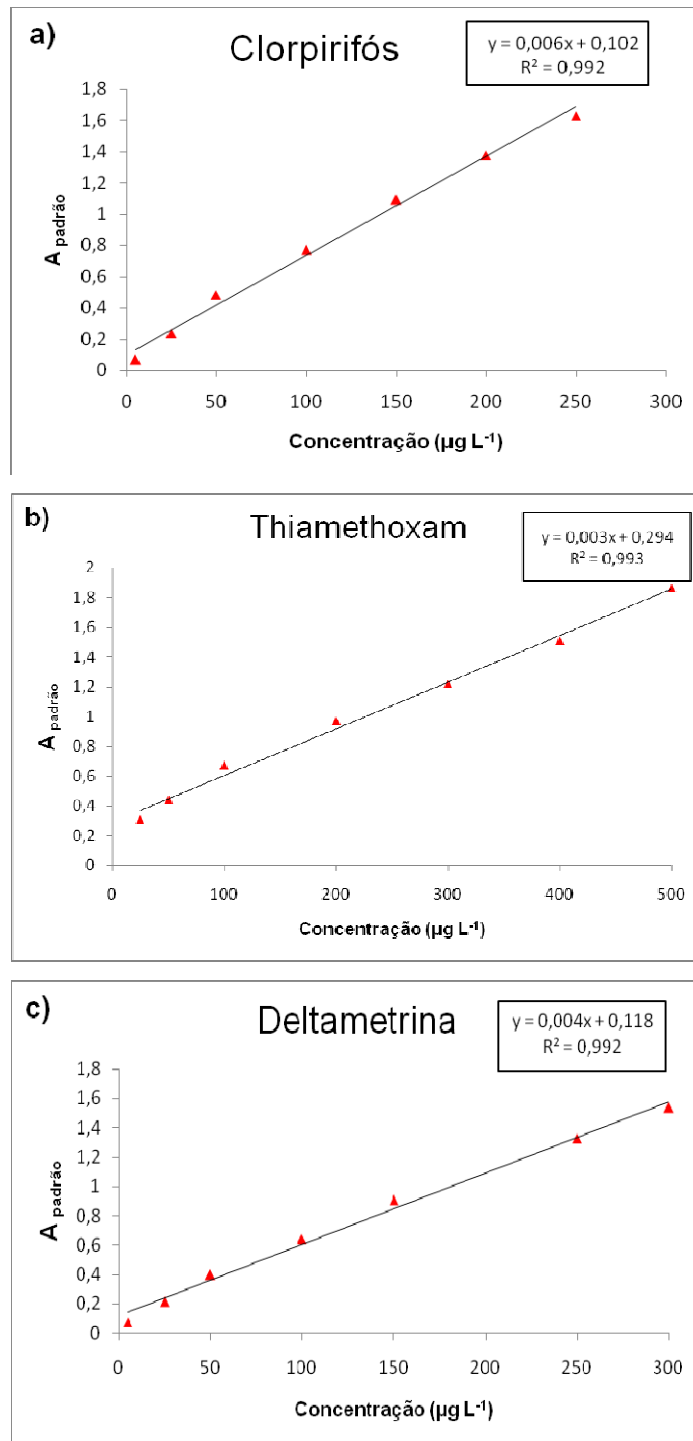


Figura 11. Curvas analíticas preparadas a partir de soluções padrão de (a) clorpirifós, (b) thiamethoxam e (c) deltametrina na faixa de concentração entre 5,0 e 500,0 µg L⁻¹, analisadas por CG-DCE.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, os valores dos coeficientes de correlação (R^2) recomendados devem ser iguais ou superiores a 0,95.

Observando os resultados obtidos pela regressão linear dos dados experimentais, verifica-se a linearidade do detector por captura de elétrons na faixa de concentração trabalhada para os agrotóxicos clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina.

3.4.3. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) para métodos cromatográficos representa a menor quantidade da substância estudada que pode ser diferenciada do sinal ruído do sistema com segurança, entretanto a detecção dispensa o caráter de quantificação do agrotóxico na análise. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito que pode ser quantificada com exatidão (INMETRO, 2003).

Amostras de maçã (3,0000 g) foram fortificadas com 100,0 μ L de soluções de concentração 0,25; 0,20; 0,15; 0,10; 0,05; 0,025 e 0,01 mg L^{-1} para os princípios ativos clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina. Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa em injeções de ordem decrescente de concentração.

Foram construídas curvas analíticas contendo os agrotóxicos clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina nas concentrações de 25,0; 20,0; 15,0; 10,0; 5,0; 2,5 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados pelo método da relação sinal-ruído (item 2.5.3), em que LD corresponde à concentração que proporcionou um sinal três vezes maior que o ruído e o LQ um sinal dez vezes maior que esse ruído (COLLINS *et al.*, 2006)

Desta forma, o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método estabelecido para o clorpirifós foi de 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, para o inseticida thiamethoxam foi de 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para a deltametrina foi de 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estes valores cobrem o LMR permitido pela ANVISA (clorpirifós

1,0 mg kg⁻¹; thiamethoxam 0,02 mg kg⁻¹ e deltametrina 0,02 mg kg⁻¹) para esses agrotóxicos em amostras de maçã.

Levando-se em consideração a massa de amostra de maçã (3,0000g), os valores de LD e LQ são, respectivamente, 8,34 e 16,67 µg kg⁻¹ para o clorpirifós, 16,67 e 50,0 µg kg⁻¹ para o thiamethoxam e 33,34 e 66,67 µg kg⁻¹ para a deltametrina.

Resultados semelhantes foram obtidos por BITTENCOURT (2008) ao analisar os agrotóxicos clorpirifós e thiamethoxam em batata por CG-DCE, obtendo LD igual a 1,7 µg L⁻¹ e LQ 5,0 µg L⁻¹, para o agrotóxico clorpirifós. Para o thiamethoxam encontrou LD igual a 3,3 µg L⁻¹ e LQ 10,0 µg L⁻¹.

VIEIRA *et al.* (2007), analisando os piretróides λ-cialotrina, cipermetrina e deltametrina em água e solo por CG-DCE obteve valores para o LD entre 1,1 e 2,9 µg L⁻¹ e LQ entre 3,3 e 9,6 µg L⁻¹.

Estudos de dispersão de matriz em fase sólida (DMFS) com suco de maçã (ALBERO, 2005), encontraram LD igual a 0,4 µg L⁻¹ e LQ 1,3 µg L⁻¹ analisando por GC-MS-SIM o agrotóxico clorpirifós. KRISTENSON *et al.*, (2001), avaliando clorpirifós por GC-MS em maçã, encontrou LD igual a 6,25 µg L⁻¹, ao utilizar dispersão de matriz em fase sólida (DMFS) em pequena escala.

Em suma, os resultados apresentados neste trabalho não se distanciam de outros trabalhos envolvendo agrotóxicos em comum, porém em diferentes matrizes, empregando-se variados métodos de extração e análise.

Segundo RIBANI *et al.* (2004), LD e LQ podem ser influenciados pelo tipo e tempo de uso da coluna cromatográfica, a estabilidade do detector utilizado e obviamente do tipo de detector.

3.4.4. Precisão

A precisão expressa a concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra (RIBANI, 2004). Normalmente se apresenta em termos de desvio padrão e desvio padrão relativo também conhecido como coeficiente de variação (CV).

Neste trabalho, a precisão foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária.

3.4.4.1. Repetitividade

A repetitividade foi avaliada pelo cálculo da estimativa do coeficiente de variação (CV) de sete ensaios (INMETRO, 2003) do procedimento otimizado da ESL-PBT em amostra de maçã, para os agrotóxicos clorpirifós e deltametrina, de concentração $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e thiamethoxam de concentração igual a $500,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

As porcentagens de recuperação obtidas (%R) e os coeficientes de variação (CV) estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Porcentagem de recuperação (%R) e coeficiente de variação, CV (%), obtidos após sete extrações em amostras de maçã dos agrotóxicos clorpirifós ($100,0 \mu\text{g L}^{-1}$), thiamethoxam ($500,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e deltametrina ($100,0 \mu\text{g L}^{-1}$).

	% Recuperação	% CV
Clorpirifós	86,1	2,1
Thiamethoxam	80,4	3,6
Deltametrina	83,3	3,5

N = 2

Os resultados do coeficiente de variação obtidos para os três agrotóxicos na amostra de maçã variaram entre 2,1% e 3,6 %. Tais resultados demonstram a repetitividade da metodologia, uma vez que os coeficientes de variação se encontram bem abaixo do recomendado para amostras complexas, como a maçã. Segundo RIBANI *et al.* (2004), são aceitáveis CV de até 20% para amostras complexas.

3.4.4.2. Precisão Intermediária

Indica o efeito das variações dentro do laboratório, devido a eventuais fatores como a análise feita em diferentes dias, executadas por mais de um analista ou utilização de equipamentos diferentes ou a combinação entre estes fatores (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão intermediária do método foi verificada pelas porcentagens de recuperação dos agrotóxicos e respectivos coeficientes de variação (CV) analisados em três dias diferentes. As análises foram realizadas aos 7 e 30 dias após o primeiro teste, pelo mesmo analista, mesmo equipamento e no mesmo laboratório. Em todos os experimentos, as amostras foram fortificadas com $100,0$

μL de uma solução de concentração $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ para o clorpirifós e deltametrina e concentração igual a $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ para thiamethoxam.

Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 10.

Tabela 10. Porcentagem de recuperação (% R) e coeficiente de variação (CV) obtida após a análise em dias diferentes, pelo mesmo analista.

	Clorpirifós		Thiamethoxam		Deltametrina	
	%R	%CV	%R	%CV	%R	%CV
1 dia	88,7	1,9	73,0	6,6	84,4	4,2
1 semana	85,5	3,1	77,2	2,7	81,1	3,3
1 mês	91,2	3,8	81,7	2,3	87,8	3,8

N = 2

É possível concluir, para os princípios ativos analisados em maçã, a boa precisão intermediária para os ensaios apresentados com coeficientes de variação (%CV) inferiores a 6,6%. Segundo RIBANI *et al.* (2004), em métodos de análise de traços, são aceitos CV de até 20%, dependendo da complexidade da amostra.

3.4.5. Exatidão

A exatidão da ESL-PBT foi avaliada realizando ensaios de recuperação em amostras de maçã, fortificadas com concentrações que eram 1, 2 e 10 vezes o LQ de cada agrotóxico. As concentrações das soluções do clorpirifós foram 0,05; 0,10 e $0,50 \text{ mg L}^{-1}$, para o thiamethoxam 0,15; 0,30 e $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ e para deltametrina 0,20; 0,40 e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$. As amostras de maçã foram fortificadas com $100,0 \mu\text{L}$ de cada uma das soluções dos princípios ativos. As concentrações finais para o clorpirifós foram $50,0$, $100,0$ e $500,0 \mu\text{g L}^{-1}$, para o thiamethoxam $150,0$, $300,0$ e $1500,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e para a deltametrina $200,0$, $400,0$ e $2000,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 11. Porcentagem de recuperação (%R) e coeficiente de variação (%CV) obtidos após extração das amostras de maçã fortificadas com o inseticida clorpirifós em três concentrações diferentes.

Clorpirifós		
($\mu\text{g L}^{-1}$)	%R	%CV
5	95,2	3,6
10	93,1	8,6
50	91,0	1,3

N = 2

Tabela 12. Porcentagem de recuperação (%R) e coeficiente de variação (%CV) obtidos após extração das amostras de maçã fortificadas com o inseticida thiamethoxam em três concentrações diferentes.

Thiamethoxam		
($\mu\text{g L}^{-1}$)	%R	%CV
15	88,4	9,2
30	84,4	8,7
150	81,5	5,1

N = 2

Tabela 13. Porcentagem de recuperação (%R) e coeficiente de variação (%CV) obtidos após extração das amostras de maçã fortificadas com o inseticida deltametrina em três concentrações diferentes.

Deltametrina		
($\mu\text{g L}^{-1}$)	%R	%CV
20	108,6	16,2
40	96,2	5,1
200	91,2	9,3

N = 2

Percebe-se que as porcentagens de recuperação encontradas nos ensaios de precisão e exatidão divergem entre si, especialmente para o thiamethoxam. Isto pode ser explicado pela diferença nas concentrações dos agrotóxicos. A avaliação da precisão intermediária foi desenvolvida fortificando amostras de maçã com 100,0 μL de uma solução de concentração de 5,0 mg L^{-1} para o thiamethoxam, enquanto que, para os ensaios de exatidão, as amostras foram fortificadas com 100,0 μL de soluções de concentração 0,15; 0,30 e 1,5 mg L^{-1} .

Essa variação na eficiência da extração em função da concentração foi observada por MENKISSOGLU-SPIROUDI & FOTOPOULOU (2004) ao avaliar o efeito de matriz na determinação de resíduos de agrotóxicos por cromatografia

gasosa. Eles observaram que apesar das porcentagens de recuperação oscilarem para cada agrotóxico, um maior efeito de matriz era notado quando se trabalhava com uma menor concentração do agrotóxico na amostra. Resultados semelhantes foram observados por JIMÉNEZ et al. (1998), ao reduzir a concentração dos analitos clorpirifós e eldrin na amostra de mel de 2,5 a 0,025 mg kg⁻¹. As porcentagens de recuperação para os agrotóxicos aumentaram de 182 para 589% e de 210 para 573%, respectivamente.

O presente estudo obteve porcentagens de recuperação entre 73,00 e 108,38% para clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina. A maior dispersão (%CV = 16,19) se deve a deltametrina em concentração igual a 20 µg L⁻¹, justificando a influencia das baixas concentrações no aumento do efeito de matriz.

Como a concentração das amostras está muito próxima ao LQ é aceitável valores de CV(%) de até 20% (RIBANI, et al. 2004; BRITO et al. 2002).

3.5. Avaliação do efeito de matriz

Na quantificação dos agrotóxicos em maçã, o recurso utilizado foi a comparação da razão entre, as áreas dos agrotóxicos e áreas do padrão interno presentes no extrato, com as curvas analíticas dos padrões (razão entre área dos agrotóxicos/área do padrão interno). Vários estudos têm mostrado que outros compostos presentes nas amostras são co-extraídos juntamente com os agrotóxicos de interesse. A presença desses co-extrativos pode prejudicar a quantificação dos agrotóxicos por CG (MENKISSOGLU-SPIROUDI & FOTOPOULOU, 2004). Além disso, a injeção continua desses co-extrativos pode levar ao acúmulo de impurezas no sistema cromatográfico acarretando problemas no sistema de injeção, coluna e detecção.

O sistema de injeção do cromatógrafo a gás contém um *liner*, ou insertor, onde a amostra é introduzida. Este componente do injetor é de vidro, contendo na superfícies grupos silanois que atuam como sítios ativos. Quando o extrato da amostra é injetado, todos os componentes da amostra são volatilizados antes de seguirem para a coluna. Durante a volatilização, todas as substâncias presentes podem sofrer interação com os sítios ativos do *liner* (ERNEY et al, 1993).

Na injeção de uma solução padrão preparada em solvente puro, apenas os agrotóxicos da solução são expostos aos sítios ativos do *liner* (insertor). Ao passo que na injeção de um extrato, ocorre uma competição entre os agrotóxicos de interesse e os co-extratos presentes na amostra pelos sítios ativos do liner. Assim, uma quantidade maior de analito alcança a coluna e conseqüentemente o detector (SCHENCK & LEHOTAY, 2000).

Ao se desenvolver um método analítico, os possíveis efeitos de matriz na análise cromatográfica devem ser levados em consideração mesmo para comprovar a ausência ou presença do fenômeno sobre uma longa faixa de concentração do analito na matriz.

Neste trabalho, na primeira etapa do estudo de efeito de matriz, foram construídas três curvas analíticas para os agrotóxicos investigados.

A primeira curva padrão foi construída com soluções padrão dos agrotóxicos clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina preparados em acetonitrila.

Na segunda curva analítica, estas soluções padrão foram preparadas em um extrato de maçã livre de agrotóxicos (branco).

A terceira curva analítica foi obtida pela injeção das soluções padrão preparadas em acetonitrila, sendo cada solução padrão injetada após 3 injeções sucessivas de extrato de maçã isenta de agrotóxicos. Neste ensaio é simulada a saturação do injetor com os co-extrativos da matriz.

Extratos de amostras de maçãs, obtidos a partir do método otimizado descrito no 2.3.3, nas concentrações 25,0; 50,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os três princípios ativos foram estudados. Após a injeção, os agrotóxicos foram quantificados comparando-se suas áreas obtidas no extrato com as respectivas áreas adquiridas em cada curva padrão preparada descritas nos itens 2.6.1, 2.6.2 e 2.6.3.

As Figuras abaixo mostram a análise dos dados para cada agrotóxico comparados com as três curvas analíticas padrões.

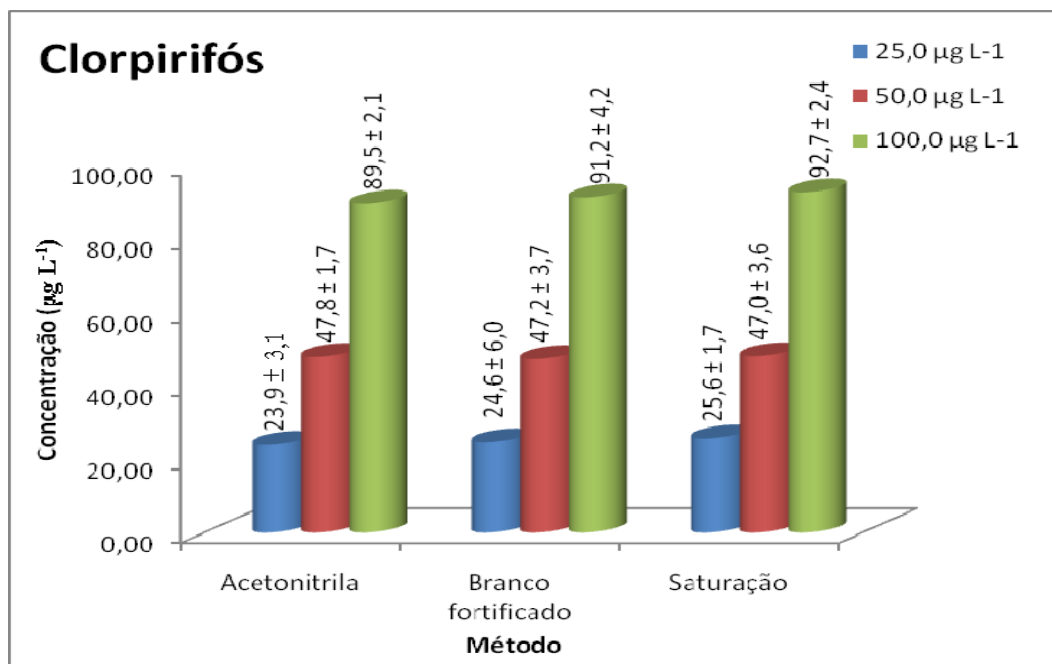


Figura 12. Valores das concentrações obtidas para clorpirifós em extratos de amostra de maçã fortificadas com 100,0 µL de soluções de concentração 0,25; 0,50 e 1,0 mg L⁻¹, quando comparados com curvas analíticas preparadas em acetonitrila, no extrato de maçã isento de agrotóxico e em acetonitrila após saturação do sistema.

A quantificação do clorpirifós, em amostras de maçã fortificada com 100,0 µL de soluções de concentração 0,25; 0,50 e 1,0 mg L⁻¹, foi feita comparando-se os resultados obtidos da injeção do extrato, com os resultados encontrados para as curvas analíticas preparadas em acetonitrila, no extrato de maçã isento de agrotóxico e em acetonitrila após saturação do sistema.

Os valores de concentração encontrados para o clorpirifós, quando comparados com as diferentes curvas analíticas, estão bem próximos para uma mesma concentração, apresentando uma faixa de coeficiente de variação entre 1,68 e 6,01.

Estes valores de concentrações próximos, para curvas analíticas preparadas de maneiras diferentes, indicam o pequeno efeito de matriz para o clorpirifós. O que era esperado já que, este princípio ativo possui massa pequena com baixo ponto de ebulição, facilitando sua volatilização tornando sua chegada à coluna mais rápida.

O mesmo foi observado por PINHO (2007) quando o agrotóxico clorpirifós foi analisado em extratos de tomates. Apesar da diferença nas porcentagens de extração não excederem 10%, neste caso o efeito de matriz foi considerado.

A Figura 13 apresenta os resultados obtidos para o thiamethoxam.

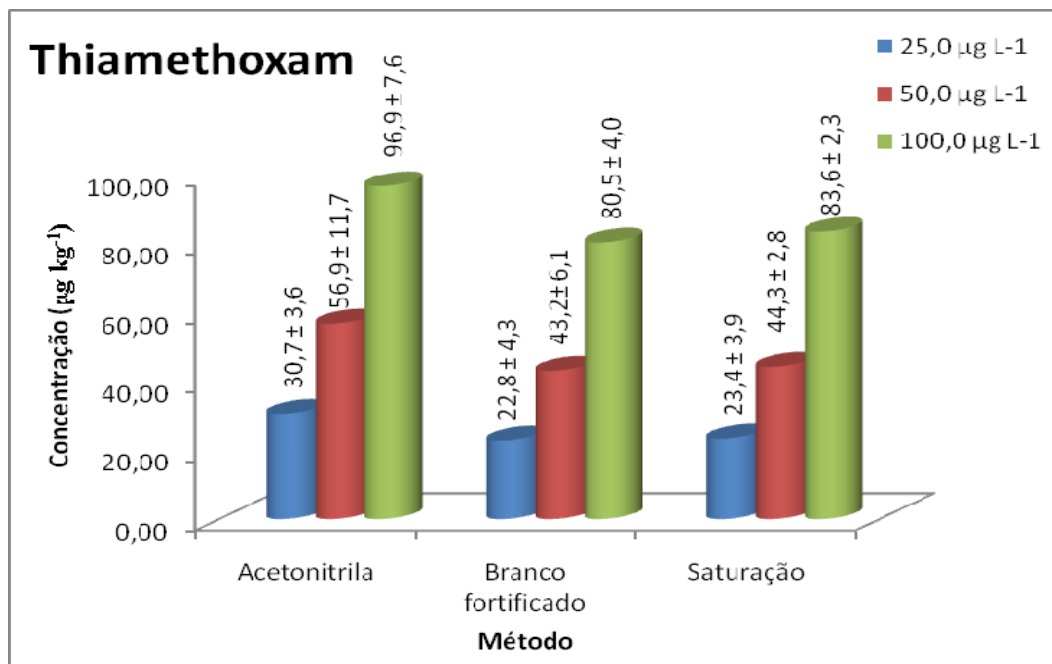


Figura 13. Valores das concentrações obtidas para thiamethoxam em extratos de amostra de maçã fortificadas com 100,0 µL de soluções de concentração 0,25; 0,50 e 1,0 mg L⁻¹, quando comparados com curvas analíticas preparadas em acetonitrila, no extrato de maçã isento de agrotóxico e em acetonitrila apos saturação do sistema.

Percebe-se que, quando se compara as áreas dos agrotóxicos obtidas nos extratos de maçã com a curva preparada em solvente puro, os valores de concentração obtidos excedem 100% de extração. Isto ocorre para os extratos fortificados com 25,0 e 50,0 µg L⁻¹, onde são encontradas concentrações iguais a 30,7 e 56,9 µg kg⁻¹ (122,7% e 113,8%) respectivamente.

Durante a injeção da curva analítica preparada em solvente puro, as moléculas do thiamethoxam interagem com os sítios ativos presentes no *liner* (insertor) de injeção, acarretando a chegada de um menor número de moléculas na coluna cromatográfica. Na injeção dos extratos de amostras da maçã

fortificadas, os co-extrativos da matriz competem com as moléculas do thiamethoxam pelos sítios ativos do *liner* de injeção. Em consequência, uma maior concentração de thiamethoxam chega à coluna cromatográfica e no sistema de detecção. Isto gera valores de porcentagens de recuperação acima de 100%, observados nos valores de concentração expostos na figura 13.

Comparando-se os resultados dos extratos de amostras de maçã fortificada, com as curvas padrões preparadas no extrato de maçã isento de agrotóxico e em acetonitrila após saturação do sistema, obtém-se valores de concentração menores. Estes valores estão abaixo de 100% de recuperação mas dentro da faixa de porcentagem permitida pela ANVISA, que varia entre 70 e 120% para análises multirresíduos.

A Figura 14 mostra a análise para o agrotóxico deltametrina.

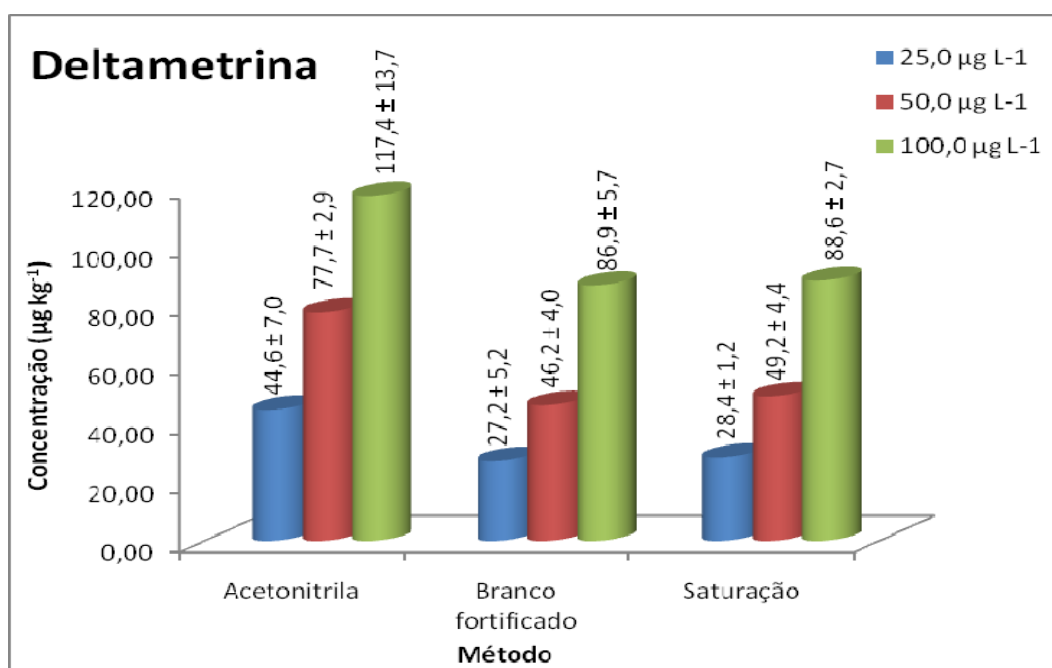


Figura 14. Valores das concentrações obtidas para deltametrina em extratos de amostra de maçã fortificadas com 100,0 µL de soluções de concentração 0,25; 0,50 e 1,0 mg L⁻¹, quando comparados com curvas analíticas preparadas em acetonitrila, no extrato de maçã isento de agrotóxico e em acetonitrila após saturação do sistema.

Valores das concentrações obtidas para deltametrina em extratos de amostra de maçã fortificadas com 100,0 µL de soluções de concentração 0,25;

0,50 e 1,0 mg L⁻¹, quando comparados com curvas analíticas preparadas em acetonitrila, foram maiores do que os valores das concentrações de fortificação da amostra de maçã.

Estes valores de concentração obtidos acima dos valores reais de fortificação das amostras de maçã são provenientes de porcentagens de recuperação acima de 100%, atribuídos ao efeito de matriz.

A deltametrina, piretróide de alta massa molecular e alto ponto de ebulição, demora mais tempo para ser volatilizada. Conseqüentemente, permanece mais tempo no sistema de injeção do cromatógrafo. Isso permite maior interação da deltametrina com os sítios ativos do *liner* de injeção. Assim, quando a curva padrão em acetonitrila é analisada, um menor número de moléculas alcança a coluna cromatográfica e o sistema de injeção. Isto pode explicar os valores de concentrações mais altos encontrados nos extratos de maçã quando comparados com a curva padrão em acetonitrila.

Ao se comparar, os resultados obtidos pelos extratos de maçã fortificada, com as curvas padrões preparadas no extrato de maçã isento de agrotóxico e em acetonitrila após saturação do sistema, ocorre uma diminuição dos valores de concentração. Esta redução se deve a presença de co-extrativos da matriz nas curvas analíticas utilizadas na quantificação da deltametrina nos extratos de amostras de maçã.

Verifica-se também a redução do efeito de matriz ao se aumentar a concentração do analito na matriz. HAJŠLOVÁ *et al.* (1998) verificou que quanto menor a concentração, mais intenso era o efeito.

É o que se observa ao comparar os resultados obtidos na curva padrão em acetonitrila para diferentes concentrações. Tem-se porcentagens de recuperação de 178,78% para concentração de 25,0 µg kg⁻¹, 155,05% para concentração de 50,0 µg kg⁻¹ e 117,16% de recuperação para concentração de 100,0 µg kg⁻¹.

3.6. Determinação dos agrotóxicos clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina em amostras comerciais de maçã

A técnica de ESL-PBT otimizada foi aplicada em cinco amostras de maçã, obtidas em comércios da cidade de Viçosa – MG originárias de diferentes fornecedores.

Nas amostras analisadas, foi constatada a presença de resíduos do agrotóxicos clorpirifós na faixa de 0,25 a 0,30 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi otimizada e validada a metodologia ESL-PBT, para análise simultânea dos agrotóxicos clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina em maçã por cromatografia gasosa.

Na etapa de otimização foram avaliados: composição da mistura extratora, tipo e o tempo de agitação, força iônica da solução aquosa 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 de pesticidas estudados, com porcentagens de recuperação acima de 70%. Além disso, a metodologia apresentou baixo consumo de solvente sendo necessária a inclusão de uma etapa de *clean up* a fim de tornar os extratos mais límpidos. Entretanto não houve perda expressiva nas porcentagens de recuperação dos analitos.

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

No estudo do efeito de matriz foi observado que a quantificação desses princípios ativos por cromatografia gasosa pode ser afetada pelos componentes da matriz. Este efeito pode ser minimizado pelo emprego de curvas analíticas preparadas em extratos da isenta de agrotóxicos (branco fortificado) ou pelo método de saturação dos sítios ativos do sistema de injeção do cromatógrafo a gás. O emprego desses métodos de quantificação permite obter resultados mais próximos dos valores reais.

A metodologia ESL-PBT otimizada e validada foi aplicada em amostras de maçã adquiridas no comércio de Viçosa-MG, sendo encontrado resíduo do

agrotóxico clorpirifós, em concentrações abaixo do limite máximo de resíduo (LMR) permitido pela legislação brasileira.

A metodologia ESL-PBT otimizada e validada foi aplicada em amostras de maçã adquiridas no comércio de Viçosa-MG, sendo encontrado resíduo do agrotóxico clorpirifós.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Anvisa divulga resultado do monitoramento de agrotóxico em alimentos*. 30 de abril de 2007. <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2007/300407.htm> Acessada em Julho de 2008.

Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Quantidade de agrotóxicos em alimentos é menor que em 2002*. 10 de maio de 2004. http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2004/100504_3.htm Acessada em Julho de 2008.

Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Novos desafios para o estudo de agrotóxicos no país*. 11 de abril de 2006. <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2006/110406.htm> Acessada em Julho de 2008.

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

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

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

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

CALDAS, E. D. ; MIRANDA, M. C. C.; CONCEIÇÃO, M. H.; SOUZA, L. C. K. Dithiocarbamates residues in Brazilian food and the potential risk to consumers.

Food and Chemical Toxicology, Estados Unidos, v. 42, n. 11, p. 1877-1883, 2004.

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

Codex Alimentarius Commission. *Pesticide Residues in Food. Methods of analysis and sampling*, 2nd Ed., Roma, 2000, vol. 2A, part 1.

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

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). *Relação de áreas contaminadas no Estado de São Paulo*. Novembro de 2007. [HTTP://www.cetesb.sp.gov.br/](http://www.cetesb.sp.gov.br/), acessada em Agosto de 2008

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

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

DARDENGO, R. P. **Análise multiresíduo de inseticidas em batata (*Solanum tuberosum* L)**. 2007. 117f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2007.

DE MELO, L. M. R.; *Produção e mercado da maçã brasileira*, Embrapa Uva e Vinho, Circular Técnica nº 64, Bento Gonçalves, RS, 2006.

DIAS, M. C.; QUEIROZ, M. E. L. R.; REIS, E. L.; NEVES, A. A.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; Determination of maneb residues, in tomatoes, by spectrophotometric method of acid hydrolysis, through multivariate calibration, **Analytical Letters**, **33**: 1857-1868, 2000.

DORNE, J.L.C.M.; SKINNER, L.; FRAMPTON, G.; SPURGEON, D.; RAGAS, A.M.J.; Human and environmental risk assessment of pharmaceuticals: differences, similarities, lessons from toxicology, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, **387**: 1618-2642, 2007.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). *Sistemas alternativos permitem reduzir impactos com agrotóxicos*. 15 de janeiro de 2008. <http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2008/janeiro/3a-semana/sistemas-alternativos-permitem-reduzir-impactos-com-agrotoxicos>
Acessada em Fevereiro de 2008.

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

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

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq) da USP. *Bioativador estimula produção de hormônios responsáveis pelo crescimento da soja*. 29 de agosto de 2006. <http://www.usp.br/agen/repgs/2006/pags/169.htm> Acessada em Janeiro de 2008.

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

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

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

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

GOULART, S. M.; QUEIROZ, M. E. 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.

Hajslova, J.; Holadova, K.; Kocourek, V.; Poustka, J.; Godula, M.; Cuhra, P. Kempny, M. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues, **Journal of Chromatography A**, **800**: 283-295, 1998.

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

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola*.

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>

acessada em Abril de 2008.

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

KOCOUREK, V.; HAJŠLOVA, 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. <http://www.agricultura.gov.br/> acessada de Janeiro a Maio de 2008.

MORAIS, L. S. R.; PEREIRA, F. S.; QUEIROZ, S. C. N.; JARDIM, I. C. S. F. **Otimização de Técnicas de Extração de Agrotóxicos em Solo para Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**. 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.

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

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

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

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

PESSINI, M. M. O. **Resíduos de acatamiprid e thiamethoxam em tomate estaqueado (*Lycopersicon esculentum* Mill), em diferentes modalidades de aplicação.** 2003. 88f. Dissertação (Mestrado na Entomologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2003.

PINHO, G. P. **Extração de agrotóxicos em amostras de tomate pelas técnicas: extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) e dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) para análise por cromatografia gasosa.** 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2007.

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

RAWN, D. F. K.; Quade, S. C.; Shields, J. B.; Conca, G.; Sun, W. F.; Lacroix, G. M. A.; Smith, M.; Fouquet, A.; Bélanger, A.; Captan residue reduction in apples as a result of rinsing and peeling, **Food Chemistry** **109**, 790-796, 2006.

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.

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

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

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

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

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

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

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

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

Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN).
<http://www.sucen.sp.gov.br/> acessada em Maio de 2008.

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

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

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

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

VILLAGRASA, M.; GUILLAMÓN, M.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. Matrix effect in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry analysis of benzoxazinoid derivatives in plant material, **Journal of Chromatography A**, **1157**: 108-114, 2007.