



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DE UM MODULADOR A AR COMPRIMIDO
PARA GC×GC E SUA APLICAÇÃO PARA
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS
PIRETRÓIDES EM UVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caroline do Amaral Friggi

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**AVALIAÇÃO DE UM MODULADOR A AR COMPRIMIDO PARA
GC×GC E SUA APLICAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE
RESÍDUOS DE PESTICIDAS PIRETRÓIDES EM UVA**

por

Caroline do Amaral Friggi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Química, Área de Concentração em Química Analítica, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito
parcial para obtenção do grau de **MESTRE EM QUÍMICA**

Orientador: Renato Zanella

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DE UM MODULADOR A AR COMPRIMIDO PARA
GC×GC E SUA APLICAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE
RESÍDUOS DE PESTICIDAS PIRETRÓIDES EM UVA**

elaborada por
Caroline do Amaral Friggi

como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Renato Zanella – Orientador
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dra. Carin von Mühlen
Centro Universitário FEEVALE

Profa. Dra. Martha Bohrer Adaime
Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, 22 de fevereiro de 2008

Aos meus pais, Zuleina e Vilson, que com tanto amor e carinho me conduziram pelos caminhos da vida, vocês que sempre me apoiaram nos momentos mais difíceis e principalmente me incentivaram a lutar pelos meus sonhos, muito obrigada será sempre muito pouco para demonstrar a minha eterna gratidão. Amo vocês!

Ao meu filho Matheus, que suportou a saudade enquanto estive longe para a realização deste trabalho, a você que enche a minha vida de orgulho e satisfação, o meu carinho e amor eterno. Te amo muito!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella pela amizade, apoio e incentivo, por todas as oportunidades que me foram proporcionadas dentro do grupo, meu muito obrigada por tudo.

A Prof. Dr^a. Martha Bohrer Adaime que apesar de exercer um cargo de grande responsabilidade como diretora do CCNE, bem como todas as suas outras atividades dentro do departamento de Química, sempre se mostrou uma pessoa acessível e disposta a ajudar. Agradeço também ao teu carinho e amizade. A ti, minha eterna admiração.

À Prof. Dr^a. Carin von Mühlen pela sua valiosa participação tanto no exame de qualificação como na defesa da dissertação, suas sugestões e questionamentos.

Ao Prof. Dr. René Vreuls da Free University (Amsterdã/Holanda) pela orientação, acolhida em seu grupo de pesquisa e ensinamentos que foram essenciais para a realização deste estudo.

Aos meus grandes amigos Márcia e Fábio que sempre se dispuseram a me ensinar e ajudar. Agradeço a amizade, carinho e incentivo por todos esses anos de convivência, que não foram muitos, mas que com certeza foram intensos. A vocês minha admiração e carinho.

Aos meus colegas do LARP, especialmente aos também amigos Osmar e Samile, com quem convivi por muito tempo, pela amizade, companheirismo e parceria para a realização deste trabalho.

A secretária do LARP, Márcia Botega, pela competência, amizade, conselhos e companheirismo. Saiba que você torna o nosso ambiente de trabalho sempre mais alegre e divertido.

A secretaria do CCNE, Sandra Botega, pela amizade, conselhos e companhia sempre prazerosa desde o tempo da graduação.

À minha grande amiga, Ana Paula Lima, por me escutar e aconselhar, por estar sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis e também nos mais felizes. Obrigada pelo carinho e amizade por todos estes anos.

Aos meus irmãos, Daniela e Marcos, pelo carinho, incentivo, torcida e ajuda que vocês sempre me deram.

À UFSM pela oportunidade, principalmente pelo ensino gratuito e de qualidade.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Química da UFSM pela contribuição na minha formação.

Aos funcionários do PPGQ, Ademir e Valéria, por sempre me recepcionarem bem e resolverem qualquer problema com agilidade e competência.

Agradeço à Deus, por ter iluminado sempre o meu caminho, por me conceder saúde, paz e sabedoria para vencer mais esta etapa.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

AVALIAÇÃO DE UM MODULADOR A AR COMPRIMIDO PARA GC×GC E SUA APLICAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS PIRETRÓIDES EM UVA

AUTOR: CAROLINE DO AMARAL FRIGGI
ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 22 de fevereiro de 2008

Neste trabalho foi desenvolvido um novo modulador, simples, robusto e de baixo custo de operação. Este modulador utiliza ar comprimido para resfriar duas pequenas porções da segunda coluna cromatográfica de um sistema GC×GC. Para avaliar o processo de modulação utilizaram-se soluções de alcanos C₇ a C₂₉ e pesticidas (bifentrina, ciflutrina, cipermetrina, esfenvalerato, fenitrotona, fipronil, trifloxistrobina e trifluralina) e análise por GC×GC-FID. Os resultados mostraram pequenas variações das áreas dos picos, entre 0,67 e 2,80% para alcanos e entre 0,24 e 5,34% para pesticidas. O desvio padrão (SD) para o tempo de retenção na primeira coluna (¹t_R) de alcanos e pesticidas foi em torno de 0,05 min. Para o tempo de retenção na segunda coluna (²t_R), o SD foi de 0,04 s para a maioria dos compostos, exceto para ciflutrina e permetrina (0,08 s). A faixa linear situou-se entre 0,1 e 5,0 mg L⁻¹ com coeficiente de determinação (r²) maior que 0,9945 para os pesticidas analisados por GC×GC-FID. O sistema GC×GC proposto foi aplicado na determinação de pesticidas piretróides (bifentrina, cipermetrina, deltametrina, fenvalerato e esfenvalerato, e permetrina cis e trans) em amostras de uva cultivar Itália fortificadas em 3 níveis (0,02; 0,05 e 0,5 mg kg⁻¹). As amostras foram extraídas pelo método de mini-Luke modificado (método da acetona) e os pesticidas quantificados por GC×GC-μECD. Os parâmetros avaliados de validação do método foram: curva analítica, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão (em termos de repetitividade e precisão intermediária) e exatidão (recuperação), bem como o efeito matriz na resposta cromatográfica. Todas as curvas analíticas apresentaram faixa linear entre 0,02 e 0,5 mg L⁻¹ com valores de r² maiores que 0,9956 e 0,9994 para as curvas preparadas em solvente (acetato de etila) e extrato da matriz (uva), respectivamente. A partir dos resultados obtidos através do cálculo do efeito matriz percentual concluiu-se que os pesticidas piretróides avaliados apresentaram considerável efeito matriz negativo. Os valores de LOQ do método foram de 0,01 a 0,02 mg kg⁻¹ para todos os piretróides. A recuperação para os 3 níveis de fortificação ficou entre 94,3 e 115,2%, com boa precisão (RSD<18,4%), o que mostrou que o desempenho do método mini-Luke modificado empregado para as extrações é satisfatório. Este estudo mostrou também, que o sistema GC×GC-μECD com modulador de duplo jato de ar comprimido tem potencial para aplicação nas análises de resíduos de pesticidas piretróides em uva, uma vez que fornece baixos valores de LOD e LOQ, e boa precisão da resposta analítica.

Palavras Chave: GC×GC; moduladores; pesticidas; frutas

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduate Program in Chemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EVALUATION OF A COMPRESSED AIR MODULATOR FOR GC×GC AND APPLICATION TO DETERMINATION OF PYRETHROID PESTICIDES RESIDUES IN GRAPE

AUTHOR: CAROLINE DO AMARAL FRIGGI
ADVISOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA
Santa Maria, February, 2008

In this study, a new modulator that is simple, robust and presents low operation costs was developed. This modulator uses compressed air to cool two small portions of the second chromatographic column of a GC×GC system. To evaluate the modulation process, solutions of alkanes C₇ to C₂₉, and pesticides (bifenthrin, cyfluthrin, cypermethrin, esfenvalerate, fenitrothion, fipronil, trifloxystrobin and trifluralin) were analyzed by GC×GC-FID. The results showed small variations of the peaks areas, between 0.67 and 2.80% for alkanes and between 0.24 and 5.34% for pesticides. The standard deviation (SD) for the retention time in the first column (¹t_R) was around 0.05 min, for alkanes and pesticides. For retention times in the second column (²t_R), the SD was 0.04 s for the majority of the compounds, except for cyfluthrin and permethrin (0.08 s). The linear range was between 0.1 and 5.0 mg L⁻¹ with a coefficient of determination (r²) greater than 0.9945 for pesticides analyzed by GC×GC-FID. The GC×GC system proposed was applied in the determination of pyrethroid pesticides (bifenthrin, cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate and esfenvalerate and permethrin cis and trans) in grape samples Italy cultivar spiked at 3 levels (0.02, 0.05 and 0.5 mg kg⁻¹). Samples were extracted by the mini-Luke modified method (acetone method) and pesticides were quantified by GC×GC-μECD. The parameters evaluated in the validation of the method were: analytical curve, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision (in terms of repetitivity and intermediate precision) and accuracy (recovery), as well as the matrix effect on the chromatographic response. All analytical curves showed a linear range between 0.02 and 0.5 mg L⁻¹ with r² greater than 0.9956 and 0.9994 for the curves prepared in solvent (ethyl acetate) and matrix extract (grape), respectively. From the results obtained by calculation of the matrix effect percentage it can be concluded that the pyrethroid pesticides showed a considerable negative matrix effect. The values of method LOQ were 0.01 to 0.02 mg kg⁻¹ for all pyrethroids. The values of recovery for the 3 spiked levels were between 94.3 and 115.2%, with good precision (RSD<18.4%), demonstrating that the performance of the mini-Luke modified method employed for the extractions is satisfactory. This study also showed that the GC×GC-μECD system using a modulator with a double jet of compressed air has potential for application in the analysis of pyrethroid pesticide residues in grapes, since it supplies low values of LOD and LOQ, and good accuracy in the analytical response.

Keywords: GC×GC; modulators; pesticides; fruits

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema geral de um sistema GC×GC, adaptado de ADAHCHOUR (2006).....	5
Figura 2.	Esquema geral do modulador por varredura térmica (<i>Sweeper</i>)..	10
Figura 3.	Esquema geral de um Sistema Criogênico Longitudinalmente Modulado (LMCS).....	11
Figura 4.	Esquema geral de um modulador com duplo jato de CO ₂	12
Figura 5.	Geração e interpretação dos dados em GC×GC: (A) Cromatograma linear mono-dimensional, (B) separação do cromatograma inicial em segmentos, (C) alinhamento dos cromatogramas lado a lado gerando uma matriz de dados (D) transformação da matriz de dados em imagem (gráfico bidimensional), adaptado de GÓRECKI <i>et al.</i> (2006).....	17
Figura 6.	Diferentes representações para o espaço de separação de uma análise realizada por GC×GC para uma amostra de <i>Eucalyptus dunnii</i> , onde: A) diagrama de contorno, B) diagrama de cores, C) diagrama de bolhas e D) diagrama de ápices, adaptado de MÜHLEN <i>et al.</i> (2007a).....	19
Figura 7.	Fórmulas estruturais dos pesticidas selecionados para determinação em uva.....	25
Figura 8.	Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de LOD e LOQ.....	33

Figura 9.	Materiais utilizados para a execução do método de extração mini-Luke modificado A) homogeneizador ultraturrax, B) frascos dos solventes utilizados com dispensadores, C) banho termostaticado de água e D) interior da centrífuga.....	49
Figura 10.	Representação esquemática do método de análise de resíduos de pesticidas em uva, utilizando o método de extração mini-Luke modificado.....	50
Figura 11.	Esquema do modulador a ar comprimido para GC×GC: A) modulador com duplo jato ar comprimido original e B) modulador com duplo jato de ar comprimido modificado.....	53
Figura 12.	Representação do modulador com duplo jato de ar comprimido modificado.....	54
Figura 13.	Sistema GC×GC utilizado: A) controle do modulador, B) modulador (visualização da parte superior do forno) e C) modulador (visualização da parte interior do forno).....	55
Figura 14.	Três frações de cromatogramas lineares obtidos por GC×GC-FID com modulador a ar comprimido a partir de soluções padrões de alcanos: A) modulação insatisfatória, B) modulação aceitável e C) modulação perfeita.....	56
Figura 15.	Cromatograma linear obtido por GC×GC-FID a partir de uma solução contendo 18 alcanos. As condições cromatográficas estão descritas no item 3.1.....	57
Figura 16.	Visualização dos diagramas: A) de ápices e B) de cores obtidos por GC×GC-FID a partir de uma solução padrão da mistura de alcanos e pesticidas (Tabela 5) preparada em solvente orgânico (metanol).....	61
Figura 17.	Cromatograma do “branco” dos solventes e reagentes obtido por GC×GC-μECD nas condições descritas no item 3.2.....	63
Figura 18.	Cromatograma obtido por GC×GC-μECD para o extrato “branco” da uva.....	68

- Figura 19.** Cromatograma de uma solução analítica na concentração de 0,05 mg L⁻¹ dos pesticidas analisados por GC×GC-μECD preparados em A) solvente orgânico (acetato de etila), B) no extrato da uva; e C) extrato “branco da matriz” fortificado com os pesticidas piretróides ao nível de 0,05 mg kg⁻¹ (identificação de acordo com a Tabela 7)..... 69
- Figura 20.** Diagrama de cores de uma solução analítica na concentração de 0,05 mg L⁻¹ dos pesticidas analisados por GC×GC-μECD preparados em A) solvente orgânico (acetato de etila), B) no extrato da uva; e C) extrato “branco da matriz” fortificado com os pesticidas piretróides ao nível de 0,05 mg kg⁻¹ (identificação de acordo com a Tabela 7)..... 70
- Figura 21.** Curva analítica do pesticida bifentrina preparado em solvente orgânico (acetato de etila) e no extrato da matriz da uva nas condições cromatográficas descritas no item 3.2..... 71
- Figura 22.** Curva analítica do pesticida cipermetrina preparado em solvente orgânico (acetato de etila) e no extrato da matriz da uva nas condições cromatográficas descritas no item 3.2..... 72
- Figura 23.** Curva analítica do pesticida deltametrina preparado em solvente orgânico (acetato de etila) e no extrato da matriz da uva nas condições cromatográficas descritas no item 3.2..... 72
- Figura 24.** Curva analítica do pesticida fenvalerato preparado em solvente orgânico (acetato de etila) e no extrato da matriz da uva nas condições cromatográficas descritas no item 3.2..... 73
- Figura 25.** Curva analítica do pesticida permetrina preparado em solvente orgânico (acetato de etila) e no extrato da matriz da uva nas condições cromatográficas descritas no item 3.2..... 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação dos pesticidas quanto à toxicidade.....	22
Tabela 2.	Pesticidas analisados e Limites Máximos de Resíduos (MRL).....	26
Tabela 3.	Pesticidas analisados por GC×GC-FID.....	42
Tabela 4.	Pesticidas analisados por GC×GC-μECD.....	43
Tabela 5.	Parâmetros usados para avaliar o desempenho do modulador com ar comprimido para alcanos e pesticidas.....	59
Tabela 6.	Equação da reta, coeficiente de determinação (r^2) e faixa linear para os pesticidas selecionados e analisados por GC×GC-FID...	60
Tabela 7.	Pesticidas analisados por GC×GC-μECD, tempos de retenção na primeira e na segunda coluna.....	62
Tabela 8.	Resultados obtidos para as curvas analíticas dos pesticidas em acetato de etila.....	64
Tabela 9.	Resultados para as curvas analíticas dos pesticidas no extrato da matriz.....	65
Tabela 10.	Valores de LOD e LOQ para os pesticidas.....	66
Tabela 11.	Recuperação, RSD_r , RSD_{pi} do método para os pesticidas.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μ ECD – micro Detector por Captura de Elétrons, do inglês *micro-Electron Capture Detector*

1D-GC – Cromatografia Gasosa Monodimensional, do inglês *one-Dimensional Gas Chromatography*

1t_R – tempo de retenção na primeira dimensão

2t_R – tempo de retenção na segunda dimensão

ACAS – *Analytical Chemistry & Applied Sciences*

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*

CCPR – Comitê do Codex Alimentarius sobre resíduos de pesticidas, do inglês *Codex Alimentarius Committee on Pesticide Residues*

DL50 – Dose letal mediana

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO – Organização do Alimento e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization*

FID – Detector por Ionização de Chama, do inglês *Flame Ionization Detector*

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GC \times GC- μ ECD – Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplada ao micro Detector por Captura de Elétrons

GC \times GC-FID – Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplada a Detector por Ionização de Chama

GC \times GC-TOFMS – Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplada ao Detector de Espectrometria de Massas por Tempo de Vôo

- GC-GC – Cromatografia Gasosa Bidimensional
- GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*
- GPC – Cromatografia por Permeação em Gel, do inglês *Gel Permeation Chromatography*
- IDA – Ingestão Diária Aceitável
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia
- ISO – *International Standardization Organization*
- IUPAC – *International Union of Pure Applied Chemistry*
- JMPR – *Joint Meeting on Pesticide Residue*
- LC-GC – Cromatografia Líquida acoplada com Cromatografia Gasosa
- LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography Mass Spectrometer*
- LLE – Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*
- LMCS – Sistema Criogênico Longitudinalmente Modulado, do inglês *Longitudinally Modulated Cryogenic System*
- LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*
- LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*
- LOQ_m – Limite de Quantificação do Método
- MAE – Extração Assistida por Microondas, do inglês *Microwave-Assisted Extraction*
- MRL – Limite máximo de resíduo, do inglês *Maximun Residue Limit*
- MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*
- MSPD – Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês *Matrix Solid-Phase Dispersion*
- N – número de medidas
- NPD – Detector de Nitrogênio e Fósforo, do inglês *Nitrogen and Phosphorus Detector*
- PIONA – parafinas, isoparafinas, olefinas, naftalenos e hidrocarbonetos aromáticos
- PLE – Extração por Líquido Pressurizado, do inglês *Pressurised Liquid Extraction*
- P_M – Período de modulação, do inglês *Modulation Time* ou *Modulation Period*
- PSA – Amina primária secundária, do inglês *Primary Secondary Amine*

PTFE – Politetrafluretileno - Teflon[®]

QuEChERS – Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy Cheap, Rugged and Safe*

r – coeficiente de correlação

r^2 – coeficiente de determinação

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

RSD_{pi} – Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

RSD_r – Desvio Padrão Relativo para Repetitividade

s – estimativa de desvio padrão absoluto

SBSE – Extração Sortiva em Barra de Agitação, do inglês *Stir-Bar Sorptive Extraction*

SD – desvio padrão, do inglês *Standard Deviation*

SFE – Extração por Fluido Supercrítico, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid-Phase Extraction*

SPME – Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid-Phase Micro-Extraction*

TOFMS – Detector de espectrometria de massas por tempo de voo, do inglês *time-of-flight mass spectrometer*

USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *United States Environmental Protection Agency*

VWA – Ministério da agricultura na Holanda, *Food and Product Safety Authority*

x_i – valores individuais

x_m – média das medidas em replicatas

Δt – intervalo de tempo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Princípios da técnica GC×GC.....	5
2.1.1 Colunas para GC×GC.....	7
2.1.2 Moduladores para GC×GC.....	9
2.1.3 Detectores freqüentemente usados para GC×GC.....	14
2.1.4 Geração e visualização dos cromatogramas em GC×GC.....	15
2.2 Pesticidas.....	19
2.2.1 Pesticidas piretróides selecionados para determinação em uva..	23
2.3 Preparo de amostra para análises de resíduos de pesticidas..	26
2.3.1 Métodos de extração para análises de resíduos de pesticidas....	27
2.3.1.1 Método de extração Luke.....	28
2.3.1.2 Método de acetato de etila.....	29
2.3.1.3 Método QuEChERS.....	29
2.4 Validação de métodos cromatográficos para a determinação de pesticidas em uva.....	30
2.4.1 Curva analítica e linearidade.....	31
2.4.2 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	32
2.4.3 Precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	34
2.4.4 Exatidão.....	35
2.4.5 Efeito matriz.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38

3.1 Instrumentação utilizada na avaliação do novo modulador e condições instrumentais empregadas para as análises realizadas por GC×GC-FID.....	38
3.2 Instrumentação utilizada para aplicação do modulador desenvolvido na validação de método analítico e condições instrumentais empregadas para as análises por GC×GC-μECD.....	39
3.3 Equipamentos.....	40
3.4 Gases.....	41
3.5 Reagentes, Solventes e Materiais.....	41
3.6 Pesticidas selecionados.....	42
3.7 Preparo das soluções analíticas	43
3.7.1 Soluções analíticas utilizadas na avaliação do novo modulador..	43
3.7.2 Soluções analíticas utilizadas para aplicação do modulador na validação de método analítico.....	44
3.8 Análise dos solventes e reagentes pelo método de extração mini-Luke modificado.....	45
3.9 Validação do método de extração mini-Luke modificado para análise de resíduos de pesticidas em uva.....	46
3.9.1 Determinação da linearidade das curvas analíticas.....	46
3.9.2 Limite de detecção e limite de quantificação.....	46
3.9.3 Precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	47
3.9.4 Ensaios de fortificação e extração empregando o método mini-Luke modificado para avaliação da recuperação.....	47
3.9.5 Avaliação do efeito matriz dos extratos de uva analisados por GC×GC-μECD.....	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	52
4.1 Desenvolvimento de um novo modulador fixo a ar e avaliação do processo de modulação utilizando alcanos e pesticidas e análise por GC×GC-FID.....	52
4.1.1 <i>Design</i> de um novo modulador usando ar comprimido para GC×GC- FID.....	52
4.1.2 Desempenho da modulação.....	55

4.1.3	Análise de pesticidas por GC×GC-FID utilizando o modulador com ar.....	60
4.2	Aplicação do modulador a ar comprimido na avaliação do método mini-Luke modificado para extração de pesticidas fortificados em uva e análise por GC×GC-μECD.....	62
4.2.1	Análise dos solventes e reagentes pelo método de extração mini-Luke modificado.....	63
4.2.2	Validação do método de extração mini-Luke modificado para análise de resíduos de pesticidas em uva.....	63
4.2.1.1	Linearidade das curvas analíticas.....	64
4.2.2.2	Limite de detecção e limite de quantificação.....	66
4.2.2.3	Precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	66
4.2.2.4	Ensaio de fortificação e extração empregando o método mini-Luke modificado para avaliação da recuperação.....	67
4.2.2.5	Efeito matriz dos extratos de uva nas análises por GC×GC- μ ECD.....	71
5.	CONCLUSÃO.....	75
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	77
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

Após a sua introdução, em 1991, a Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC×GC, do inglês *Comprehensive two-Dimensional Gas Chromatography*) tornou-se uma das ferramentas analíticas mais poderosas para a análise de misturas complexas. Esta técnica é baseada no acoplamento, em série, de duas colunas cromatográficas com diferentes fases estacionárias. Desta forma, os compostos são submetidos a dois mecanismos independentes de separação, sendo estes transferidos da primeira para a segunda coluna através de uma interface, denominada modulador.

O modulador possui três funções principais: (a) acumular pequenas frações do efluente da primeira coluna enquanto procede normalmente a separação na primeira dimensão, (b) focalizar as frações acumuladas no tempo ou no espaço e (c) liberar as frações acumuladas na forma de pulsos estreitos para a segunda dimensão (DALLÜGE *et al.*, 2003). Os moduladores tipicamente usados em GC×GC podem ser classificados dentro de duas categorias principais: baseados em válvulas ou térmicos (HARYNUK & GÓRECKI, 2003).

Com moduladores baseados em válvulas, apenas uma pequena porção do efluente é transferido da primeira para a segunda coluna. Devido ao fato de uma grande parte da amostra original não ser transferida para a segunda coluna, há pouco ou nenhum aumento do sinal, o que torna estes moduladores menos atrativos para a análise de traços (HARYNUK & GÓRECKI, 2003).

Tradicionalmente os moduladores térmicos utilizam um segmento de um capilar de filme espesso, ou resfriamento criogênico, para acumular os analitos. A principal vantagem destes moduladores é que toda a amostra é submetida a uma segunda separação, resultando em um aumento do sinal, o que torna estes moduladores compatíveis com a análise de traços (HARYNUK & GÓRECKI, 2003).

Mesmo a GC×GC sendo uma técnica poderosa de separação, a sua aplicação em análises de rotina tem um alto custo devido ao uso de moduladores criogênicos. A utilização de CO₂ ou N₂ para modular os compostos eleva o custo da análise.

Os pesticidas são utilizados na agricultura para prevenir e controlar pragas e doenças, aumentando de forma inquestionável a produção agrícola. Entretanto, o uso indiscriminado destas substâncias apresenta riscos à saúde humana e ao meio ambiente.

Considerando a necessidade de reduzir o custo das análises de rotina de resíduos de pesticidas e a importância de monitorar os níveis de resíduos de pesticidas para que estes não proporcionem danos ao homem e ao meio ambiente, este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento de um novo modulador fixo a ar comprimido e sua aplicação para determinação de pesticidas em uva empregando um sistema GC×GC- μ ECD. Os objetivos específicos do trabalho são: (i) desenvolver um modulador fixo a ar e avaliar o processo de modulação utilizando alcanos e pesticidas em um sistema GC×GC-FID e (ii) otimizar e validar um método de extração utilizando o método de extração mini-Luke modificado e análise por GC×GC- μ ECD dos pesticidas piretróides bifentrina, cipermetrina, deltametrina, fenvalerato e esfenvalerato, e permetrina cis e trans em uva.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Desde a sua descoberta, a cromatografia evoluiu como uma ferramenta essencial para a separação de diversos compostos em diferentes amostras. Entretanto, apesar do alto poder de separação das modernas técnicas cromatográficas convencionais, em uma dimensão, algumas amostras são simplesmente muito complexas para serem analisadas de forma eficaz por estas técnicas (GÓRECKI *et al.*, 2006).

Exemplos de análises de misturas complexas podem ser encontrados em diferentes áreas como, por exemplo, na indústria petroquímica (onde a caracterização apropriada de frações diferentes produtos do petróleo é da maior importância), no setor forense, na indústria de alimentos e etc., onde uma análise mais sensível e mais seletiva a nível de traço dos analitos alvo é exigida juntamente com a habilidade de caracterizar inteiramente amostras desconhecidas (GÓRECKI *et al.*, 2006).

Em todos os exemplos citados acima, é praticamente impossível conseguir uma separação completa de todos os componentes da amostra com apenas um mecanismo de separação e, isto foi o que motivou e impulsionou o desenvolvimento de técnicas cromatográficas multidimensionais (GÓRECKI *et al.*, 2006). Em trabalho publicado em 1984, GIDDINGS descreveu e introduziu definições fundamentais e critérios para as técnicas de separação multidimensionais. Desde então, estas técnicas são usadas em muitas áreas da ciência da separação (GIDDINGS, 1990).

Análises multidimensionais em cromatografia podem ser consideradas como qualquer técnica que combine duas ou mais separações distintas, ou etapas analíticas, onde pelo menos uma das etapas envolva uma separação cromatográfica. Sendo assim, Cromatografia Líquida acoplada com Cromatografia Gasosa (LC-GC), Cromatografia Gasosa Bidimensional (GC-GC) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS) são técnicas tipicamente multidimensionais (SHOENMAKERS *et al.*, 2003).

Como exemplo em cromatografia gasosa, as separações multidimensionais tiveram inicialmente como base as técnicas de GC-GC do tipo *heart-cut*, onde

pequenas frações do efluente da primeira coluna são transferidas para uma segunda coluna, desta forma, a seletividade diferenciada desta segunda coluna fornece um aumento da resolução dos picos cromatográficos gerados (BERTSCH, 1990). Entretanto, um aumento significativo no tempo de análise (em torno de algumas horas) é observado (GEUS *et al.*, 1996).

Mesmo com o desenvolvimento dos mais modernos detectores, tais como o Detector de Espectrometria de Massas por Tempo de Voo (TOFMS, do inglês *Time-of-Flight Mass Spectrometer*), a identificação de compostos em misturas muito complexas permaneceu freqüentemente insatisfatória. Conseqüentemente, a chave para melhorar o poder de separação e de identificação deveria ser encontrado na multidimensionalidade da separação cromatográfica (GÓRECKI *et al.*, 2006).

Como alternativa para resolver os problemas descritos acima foi introduzida por LIU & PHILLIPS (1991) a técnica de Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC×GC, do inglês *Comprehensive two-Dimensional Gas Chromatography*).

O termo abrangente está relacionado a critérios, tais como, toda a amostra deve ser submetida a mecanismos independentes de separação, os quais devem ser realizados em colunas com fases estacionárias diferentes, onde todos os compostos separados na primeira coluna são transferidos para a segunda coluna (SHOENMAKERS *et al.*, 2003).

Segundo GIDDINGS (1984), para abreviar o termo bidimensional abrangente, deve-se usar um sinal de multiplicação “×”, denotando a ortogonalidade entre os mecanismos de separação, e desta maneira, deixando clara a diferença entre GC×GC e as técnicas do tipo *heart-cut*, onde o hífen é utilizado (GC-GC, LC-GC).

A ortogonalidade em GC×GC está relacionada com a utilização de colunas com fases estacionárias diferentes, as quais proporcionam mecanismos independentes de separação na primeira e na segunda dimensão, conforme será discutido no item 2.1.1. As separações ortogonais realizadas em GC×GC não necessariamente resultam na resolução ótima da amostra, entretanto, esse tipo de separação proporciona as melhores condições para a utilização máxima do espaço de separação (*separation space*) que é a região no gráfico bidimensional

de cromatografia multidimensional abrangente onde os compostos são distribuídos (MÜHLEN *et al.*, 2007a; RYAN *et al.*, 2005).

A GC×GC é uma técnica relativamente nova, capaz de separar os compostos de interesse de outros e, mais importante, do *background* da matriz. Com a introdução desta técnica há aproximadamente 15 anos atrás, tornou-se possível a separação e a identificação de muitos compostos em amostras complexas (ADAHCHOUR *et al.*, 2003; DALLÜGE *et al.*, 2003; SHELLIE *et al.*, 2001).

2.1 Princípios da técnica GC×GC

A técnica GC×GC é caracterizada pela utilização de duas colunas cromatográficas acopladas em série, contendo fases estacionárias diferentes, sendo uma de tamanho convencional e outra curta (do tipo de coluna usada para *fast-GC*), de forma que todo efluente da primeira coluna ou uma parte representativa do mesmo é conduzido para a segunda coluna através de um modulador, conforme ilustrado na Figura 1 (MÜHLEN *et al.*, 2006).

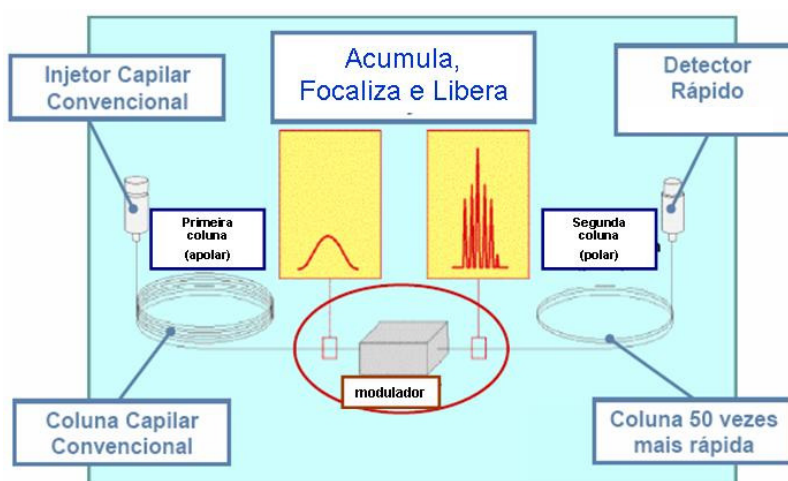


Figura 1. Esquema geral de um sistema GC×GC, adaptado de ADAHCHOUR (2006)

O sistema modulação entre as duas colunas causa uma compressão da banda cromatográfica que elui da primeira coluna e esta é direcionada para a coluna curta, de forma que a separação na segunda coluna é extremamente rápida (MÜHLEN *et al.*, 2006).

Os períodos de modulação devem ser ajustados a fim de que sejam compatíveis com o tempo de separação na segunda coluna, minimizando o alargamento da banda comprimida (MÜHLEN *et al.*, 2006). Desta forma, a sensibilidade é significativamente incrementada (relação sinal/ruído 10 vezes maior) e a resolução aumenta de forma expressiva, se comparada à técnica de cromatografia gasosa monodimensional (1D-GC, do inglês *one-Dimensional Gas Chromatography*) (DALLÜGE *et al.*, 2003; MARRIOT & SHELLIE, 2002; MÜHLEN *et al.*, 2006). Uma discussão mais detalhada sobre os moduladores será apresentada no item 2.1.2.

Em GC×GC, a eficiência da separação cromatográfica é desfavoravelmente afetada e a estrutura ordenada é perdida quando picos de diferentes ciclos de modulação co-eluem (DALLÜGE *et al.*, 2003). Portanto, as condições experimentais são geralmente ajustadas de tal maneira que, o período de modulação (P_M , do inglês *Modulation Time or Modulation Period*) que corresponde à duração de um ciclo completo de modulação, o qual é igual ao tempo entre duas injeções sucessivas na segunda dimensão, seja maior do que o tempo de retenção dos compostos mais fortemente retidos na segunda dimensão ($P_M > t_R$) (DALLÜGE *et al.*, 2003; SHOENMAKERS *et al.*, 2003). Caso contrário, quando $P_M < t_R$, analitos não eluiriam em seu próprio ciclo de modulação, o que causaria o denominado pico fora do ciclo (*wrap-around*) (DALLÜGE *et al.*, 2003; MÜHLEN *et al.*, 2007a).

A combinação de duas colunas cromatográficas com mecanismo de separação ortogonal entre si é o que leva a um significativo aumento da seletividade em GC×GC (MÜHLEN *et al.*, 2006). Tais características tornaram esta técnica extremamente útil para análise de amostras complexas, ou amostras que apresentam outras características que limitam sua caracterização por 1D-GC, como no caso das separações enantioméricas (DALLÜGE *et al.*, 2003; MARRIOT & SHELLIE, 2002).

Os picos modulados que eluem da coluna da segunda dimensão em GC×GC são cerca de 10 a 50 vezes mais estreitos do que os picos obtidos por 1D-GC, conseqüentemente, faz se necessário o uso de detectores com aquisição rápida de dados, conforme será discutido no item 2.1.3.

Outra característica específica em GC×GC é o processamento dos dados. A determinação das áreas dos analitos não é direta como em 1D-GC, pois devido ao processo de modulação, cada pico obtido em 1D-GC é segmentado em várias partes. Desta forma, a interpretação dos cromatogramas complexos gerados requer um tratamento de dados mais sofisticado do que o convencionalmente usado. O tratamento dos dados é realizado por meio de *softwares* específicos para esta técnica, os quais convertem os cromatogramas complexos gerados em diagramas, sendo que estes serão abordados no item 2.1.4.

A quantificação em GC×GC é de fato muito similar a 1D-GC, pois os cromatogramas em GC×GC são gerados a partir de um cromatograma linear. Devido a este fator podemos calcular a soma das área dos picos modulados, sendo esta uma tarefa extremamente morosa, entretanto, atualmente, pacotes comerciais de *softwares* têm sido desenvolvidos e disponibilizados.

Uma das vantagens mais importantes em GC×GC é a natureza dos cromatogramas obtidos por este sistema, onde cada analito é identificado por no mínimo dois tempos de retenção, o que torna esta técnica mais confiável quando comparada a 1D-GC (DALLÜGE *et al.*, 2003).

Resultados satisfatórios têm sido relatados em termos de eficiência de separação e, também, na classificação de compostos baseada na presença de estruturas ordenadas obtidas nos cromatogramas em GC×GC. Além disso, um aumento expressivo no poder de separação e diminuição do tempo de análise é observado quando comparada às técnicas convencionais acopladas (DALLÜGE *et al.*, 2003).

2.1.1 Colunas para GC×GC

Para que condições de separação ortogonal sejam realizadas em um sistema GC×GC, é necessário utilizar colunas que forneçam mecanismos

independentes de separação na primeira e na segunda dimensão. Sendo assim, deve-se considerar que toda separação em GC×GC é baseada em dois parâmetros: (a) na volatilidade do analito e (b) na sua interação com a fase estacionária por meio de pontes de hidrogênio, interações π - π , efeitos estéricos, etc. (BEENS *et al.*, 1998a).

Assim como na 1D-GC, devemos considerar que em uma coluna apolar a volatilidade dos analitos é o único parâmetro que governa a separação. Em todas as outras colunas, a separação é governada tanto pela interação específica com a coluna “polar” selecionada quanto pela volatilidade (DALLÜGE *et al.*, 2003).

Cada pequena fração individual eluída da primeira coluna apolar contém analitos com volatilidades muito semelhantes. A separação subsequente na segunda dimensão é tão rápida, em torno de poucos segundos, que é realizada sob condições essencialmente isotérmicas. Em outras palavras, para analitos com igual volatilidade somente a interação com a fase estacionária específica governa a retenção dos analitos na segunda dimensão (DALLÜGE *et al.*, 2003).

Em princípio, todos os tipos de fases estacionárias podem ser usadas na primeira dimensão de um sistema GC×GC. Fases estacionárias 100% dimetilpolisiloxano ou 5% fenil / 95% dimetilpolisiloxano são geralmente usadas na primeira coluna. Na prática, a seleção da primeira coluna é também influenciada pela disponibilidade de um método já otimizado em 1D-GC. Fases estacionárias 35 a 50% fenil / 65 a 50% dimetilpolisiloxano, polietilenoglicol (Carbowax), carborano (HT8) e cianopropil-fenil-dimetilpolisiloxano são tipicamente usadas na segunda coluna (DALLÜGE *et al.*, 2003).

Deve ficar claro que resultados obtidos em uma separação apolar x polar pode, em princípio, não ser realizada por uma combinação polar x apolar ou polar x polar. Em ambos os casos, os resultados obtidos na primeira separação dependem da combinação entre dois fatores: volatilidade e polaridade dos analitos. No entanto, a volatilidade também desempenha um papel importante na separação, quando uma segunda coluna apolar é utilizada, conseqüentemente, a separação na primeira e na segunda dimensão não acontecerá de forma ortogonal (DALLÜGE *et al.*, 2003).

Em geral, o tamanho convencional das colunas usadas na primeira dimensão, é tipicamente de 15 a 30 m de comprimento, 0,25 a 0,32 mm de

diâmetro interno e 0,1 a 1,0 μm de espessura de filme. A seleção das dimensões desta coluna também depende da separação desejada. Em muitos casos, onde já existe um método otimizado em um sistema 1D-GC para a amostra em análise, a primeira dimensão selecionada para a separação em GC \times GC será aquela que é convencionalmente utilizada para a separação em 1D-GC (DALLÜGE *et al.*, 2003).

A separação na segunda coluna deve ser realizada em poucos segundos, e o alargamento da banda dos pulsos estreitos gerados pelo modulador deve ser minimizado (DALLÜGE *et al.*, 2003). Portanto, colunas curtas e estreitas são comumente usadas na segunda dimensão, com tamanhos tipicamente de 0,5 a 2,0 m de comprimento, 0,1 mm de diâmetro interno e 0,1 μm de espessura de filme (ADAHCHOUR *et al.*, 2005). Em 2003 ADAHCHOUR *et al.* relataram o uso de colunas com 0,05 mm de diâmetro interno, as quais permitiram uma separação ultra-rápida, em torno de 1 s, na segunda dimensão.

2.1.2 Moduladores para GC \times GC

O modulador pode ser considerado o “coração” de um sistema GC \times GC e, conseqüentemente, nos primeiros anos muitos esforços foram dedicados para o desenvolvimento de um modulador robusto e com uma ampla faixa de aplicação (DALLÜGE *et al.*, 2003).

Independente do seu *design* um modulador deve desempenhar três funções: (a) acumular pequenas frações do efluente da primeira coluna enquanto procede normalmente a separação na primeira dimensão; (b) focalizar as frações acumuladas no tempo ou no espaço; (c) liberar as frações acumuladas na forma de pulsos estreitos para a segunda dimensão (DALLÜGE *et al.*, 2003).

Os moduladores utilizados para executar as separações em GC \times GC podem ser classificados em duas categorias principais: os térmicos e os baseados em válvulas (HARYNUK & GÓRECKI, 2003).

Os primeiros moduladores desenvolvidos para GC \times GC utilizavam dessorção térmica, tais como o **modulador de dois estágios aquecidos** (*dual-*

stage thermal modulator), os quais não foram muito robustos além de serem de difícil fabricação (LIU & PHILLIPS, 1991).

Os primeiros moduladores disponíveis comercialmente foram os **moduladores por varredura térmica** (*thermal sweeper*) caracterizados pelo uso de um capilar de filme espesso, posicionado entre a primeira e a segunda coluna, para reter e acumular o analito no final da primeira coluna, empregando razão de fases como efeito de focalização (PHILLIPS *et al.*, 1999).

O modulador por varredura térmica (Figura 2) utilizava um aquecedor rotativo, o qual passava ao longo do capilar de filme espesso (tubo modulador), a uma temperatura aproximadamente 100 °C acima da temperatura do forno. A fração acumulada era então transferida para fora do tubo modulador quando as fendas do aquecedor passavam ao longo deste tubo, resultando na liberação da fração anteriormente acumulada para dentro da segunda coluna (SHELLIE *et al.*, 2002).

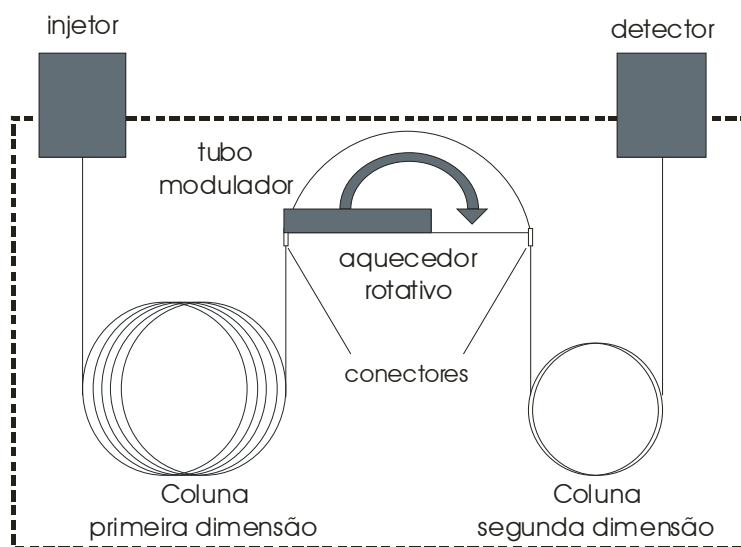


Figura 2. Esquema geral do modulador por varredura térmica (*Sweeper*)

A principal desvantagem deste modulador foi a limitada faixa de aplicação (temperatura máxima de eluição a 230 °C), pois para evitar o super-aquecimento da fase estacionária da coluna na região modulada, a temperatura máxima do forno não deveria exceder 100 °C (BERTSCH, 2000; DALLÜGE *et al.*, 2003). Além desta desvantagem, problemas relacionados à instalação e operação,

devido à presença de várias partes móveis, limitaram o uso deste modulador (DALLÜGE *et al.*, 2003). Por outro lado, em um *review* publicado em 2003 por DALLÜGE *et al.* foi relatado que até a presente data, aproximadamente 30% dos artigos de pesquisa publicados utilizavam o *sweeper* como modulador o que comprova o grande uso inicial dessa geração de moduladores.

Na próxima geração de moduladores, partes móveis foram evitadas ou o seu movimento foi simplificado, e o aquecimento foi substituído pelo resfriamento por meios criogênicos (HARYNUK & GÓRECKI, 2002; LEDFORD & BILLESBACH, 2000).

KINGHORN & MARRIOT (1999) desenvolveram o primeiro sistema criogênico (Figura 3) denominado **Sistema Criogênico Longitudinalmente Modulado** (LMCS, do inglês *Longitudinally Modulated Cryogenic System*), o qual utiliza expansão de CO₂ líquido, como armadilha criogênica, para acumular e focalizar os analitos nos primeiros centímetros da segunda coluna. Logo após um período de tempo pré-fixado, a armadilha criogênica, a qual é movida por um pistão, é rapidamente transferida para a posição de liberação. A zona contendo o analito focalizado é agora exposta ao ar do forno do GC e, conseqüentemente, o analito é rapidamente re-volatilizado e re-injetado como uma banda muito estreita na segunda coluna. Como vantagem este modulador apresenta uma ampla faixa de aplicação, embora analitos voláteis não sejam suficientemente retidos.

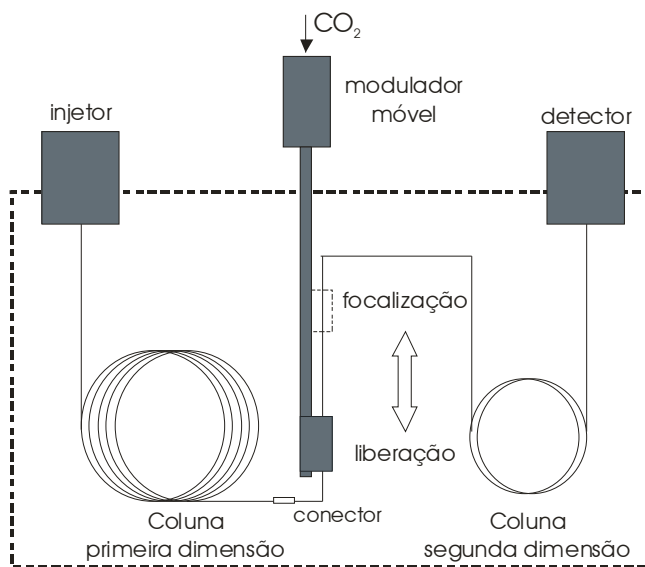


Figura 3. Esquema geral de um Sistema Criogênico Longitudinalmente Modulado (LMCS)

Nos últimos anos, vários tipos de **moduladores baseados em jatos**, tanto com dióxido de carbono quanto nitrogênio líquido para o resfriamento, começaram a dominar o campo dos moduladores e lentamente substituir os LMCS. É importante salientar que, em um período de 12 meses, de 2003 a 2004 no mínimo 10 novos moduladores foram relatados na literatura científica. A principal vantagem nesta nova geração de moduladores é a ausência de qualquer peça móvel, o que tornou este sistema de jatos muito mais robusto (ADAHCHOUR *et al.*, 2006).

Não existe, até o momento, um consenso sobre qual é, ou deveria ser o melhor *design* para este modulador como, por exemplo, jato simples, dois ou quatro jatos moduladores (ADAHCHOUR *et al.*, 2006). Entretanto, um estudo comparativo realizado por KRISTENSSON *et al.* em 2003 mostrou que o modulador de duplo jato com CO₂ líquido para o resfriamento (Figura 4) é uma interface totalmente satisfatória e robusta para praticamente todas as aplicações, e neste caso, larguras de pico a meia altura foram encontradas em torno de 45-95 ms para uma variedade de compostos testados. A determinação de compostos com volatilidades muito baixas, com pontos de ebulição menores do que o hexano é a principal exceção. Para este tipo de análise, nitrogênio líquido ou gasoso é necessário para o resfriamento, pois a faixa de aplicação de 100 a 500 °C (pontos de ebulição de C₈ a C₃₆) pode ser ampliada para aproximadamente -160 a 500 °C (C₁ a C₃₆) (GAINES & FRYSINGER, 2004).

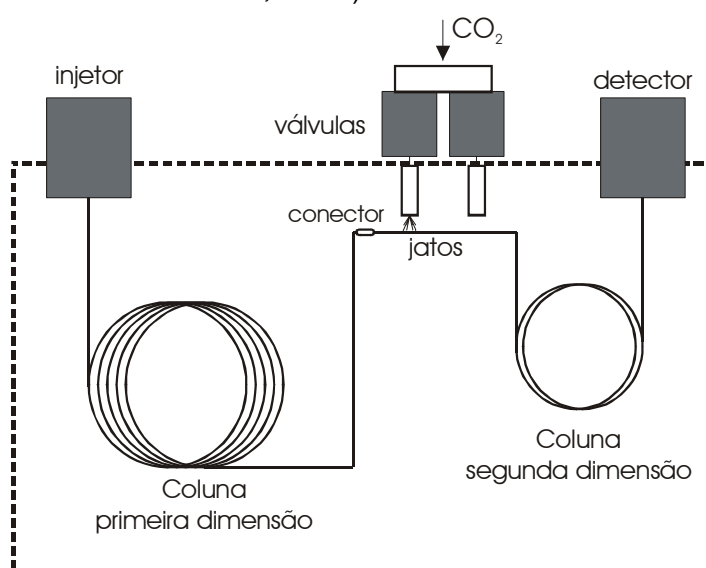


Figura 4. Esquema geral de um modulador com duplo jato de CO₂

O **modulador térmico com resfriamento a ar**, foi descrito por LIBARDONI *et al* (2005), o qual é ligado eletricamente e não utiliza materiais criogênicos e gás comprimido para o funcionamento. Este modulador de estágio simples é ligado por pulsos de corrente através de uma fonte de alimentação de corrente diferencial e resfriado por uma unidade de refrigeração convencional de dois estágios. A unidade de refrigeração, juntamente com um trocador de calor e a bomba de recirculação, resfria o modulador a uma temperatura de aproximadamente -30 °C. O tubo modulador de aço inoxidável é revestido com um filme interno de dimetilpolisiloxano, com dimensões de 0,18 mm de diâmetro interno x 8 cm de comprimento (LIBARDONI *et al.*, 2005).

O modulador descrito é muito simples e robusto. As únicas partes mecânicas neste sistema são a bomba de recirculação de ar e a unidade de refrigeração convencional, sendo que ambas necessitam de poucas manutenções. Custos de operação são muito menores do que os moduladores que utilizam meios criogênicos para o resfriamento. Entretanto, o ar utilizado para o resfriamento neste modulador não é capaz de assegurar temperaturas tão baixas quanto os moduladores criogênicos, sendo esta uma limitação deste modulador com relação à análise de compostos muito voláteis (LIBARDONI *et al.*, 2005).

Outra classe de moduladores está baseada na modulação através de válvulas, as quais podem ser classificadas em: válvulas de diafragma ou válvulas com modulação diferencial da vazão.

Os moduladores de válvulas de diafragma permitem a liberação e a injeção somente de uma pequena e estreita fração do analito, uma vez que, menos de 2% deste é transferido para dentro da segunda coluna. Devido a esta característica, estes moduladores tornaram-se inadequados para a análise de traços (BRUCKNER *et al.*, 1998; FRAGA *et al.*, 2002).

Os moduladores baseados em válvulas com modulação diferencial da vazão permitem a transferência de aproximadamente 80% do analito da primeira para a segunda coluna (SEELEY *et al.*, 2000).

Ambos os moduladores baseados em válvulas apresentam uma temperatura limite de operação relativamente baixa (cerca de 175 °C), o que limita muito suas aplicações (DALLÜGE *et al.*, 2003).

2.1.3 Detectores freqüentemente usados para GC×GC

A separação muito rápida realizada na coluna da segunda dimensão, resulta em picos com larguras de base, tipicamente, de 100 a 600 ms (DALLÜGE *et al.*, 2003). A largura do pico depende do tipo de modulador usado, da vazão do gás na coluna cromatográfica, das dimensões da segunda coluna e, uma vez que esta separação é isotérmica, do tempo de retenção nesta dimensão (DALLÜGE *et al.*, 2003).

Picos estreitos requerem detectores rápidos com um volume interno pequeno e uma elevada taxa de aquisição dos dados para assegurar uma correta reconstrução do cromatograma na segunda dimensão. Até recentemente a detecção em GC×GC era limitada a utilização de Detecção por Ionização de Chama (FID, do inglês *Flame Ionization Detection*) (DALLÜGE *et al.*, 2003). Os FIDs modernos possuem um volume interno insignificante e podem adquirir dados a uma freqüência que varia de 50 a 200 Hz, o que os tornam compatíveis com esta técnica (BEENS *et al.*, 1998b).

Embora o FID seja o detector mais adequado para a detecção de hidrocarbonetos e também, seja utilizado freqüentemente na identificação e na quantificação de produtos petroquímicos (REDDY *et al.*, 2007), para a determinação de pesticidas ele não é o detector mais apropriado, pois existem detectores mais seletivos, como o μ ECD e o NPD.

Atualmente, o micro Detector por Captura de Elétrons (μ ECD, do inglês *micro-Electron Capture Detector*) tem sido muito usado em GC×GC; além do mais, o seu volume interno de 30 a 150 μ L pode causar um aumento do sinal (KORYTÁR *et al.*, 2002; KRISTENSSON *et al.*, 2003). A freqüência de aquisição dos dados de um μ ECD é tipicamente 50 Hz, compatível com o sistema GC×GC (DALLÜGE *et al.*, 2003). O μ ECD é amplamente utilizado para determinação de compostos halogenados tais como, bifenilas policloradas (PCBs) em amostras ambientais e de alimentos (BORDAJANDI *et al.*, 2005; KORYTAR *et al.*, 2005).

O emprego da Detecção de Nitrogênio e Fósforo (NPD, do inglês *Nitrogen and Phosphorus Detection*) na GC×GC oferece boa sensibilidade para compostos que contenham fósforo e nitrogênio, para a análise de resíduos de pesticidas em amostras de vegetais (KHUMMUENG *et al.*, 2006). A freqüência de aquisição dos

dados de um NPD pode chegar a 200 Hz, o que o torna compatível com técnica de GC×GC (MÜHLEN *et al.*, 2007b).

Os detectores mencionados acima permitem identificação dos picos, mas não fornecem informação estrutural. O uso da detecção espectrométrica, especificamente a Espectrometria de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*), é, portanto, indispensável para assegurar a identificação dos numerosos compostos separados. Atualmente, somente o TOFMS pode adquirir 50 ou mais espectros por segundo, os quais são necessários para a correta recombinação dos picos modulados em GC×GC bem como para a devida quantificação (ADAHCHOUR *et al.*, 2006; DALLÜGE *et al.*, 2003).

O TOFMS combinado ao sistema GC×GC fornece uma das ferramentas mais poderosas de separação e identificação disponível atualmente (GÓRECKI *et al.*, 2006). Entretanto, o custo elevado resultante deste acoplamento, restringe o acesso desta instrumentação para muitos laboratórios.

Resultados utilizando GC×GC-TOFMS para análises de amostras petroquímicas, óleos essenciais e determinação a nível traço de pesticidas em vegetais, tem sido relatados. Eles demonstram uma excelente compatibilidade entre o mecanismo de separação e o sistema de detecção (DALLÜGE *et al.*, 2003).

2.1.4 Geração e visualização dos cromatogramas em GC×GC

A primeira diferença entre os dados obtidos por 1D-GC e GC×GC é o cromatograma gerado. Enquanto que na 1D-GC cada pico representa um composto, ou mais de um composto, no caso de co-eluição, em GC×GC cada pico primário (do inglês *Parent Peak*), que corresponde ao pico o qual dá origem aos picos modulados obtidos por GC×GC, obtido por 1D-GC é dividido em vários segmentos, denominados picos modulados (*Modulated Peak*), que são gerados pela separação na segunda coluna, após o processo de modulação, sendo que estes quando agrupados representam o pico primário (GÓRECKI *et al.*, 2006; MÜHLEN *et al.*, 2007a; SEELEY, 2002). Se levarmos em consideração apenas este efeito, a complexidade do cromatograma aumentaria em 3, 4, ou mais vezes,

dependendo do número de modulações realizadas por pico primário (MÜHLEN, 2007).

A interpretação dos resultados produzidos em GC×GC requer um tratamento de dados mais sofisticado do que em 1D-GC, em virtude do aumento de volume e complexidade de informação analítica (GÓRECKI *et al.*, 2006; MÜHLEN, 2007). A transformação do sinal analítico em imagem pode ser realizada por *softwares* específicos desenvolvidos por diferentes grupos de pesquisa, ou mais recentemente, por outros *softwares* comercialmente disponíveis (GÓRECKI *et al.*, 2006; HARYNUK *et al.*, 2002).

O detector grava um sinal contínuo, desta forma, o cromatograma linear produzido é de elevada complexidade considerando o número de picos gerados devido à modulação (Figura 5A). Sendo assim, o cromatograma linear deve ser convertido em matrizes de dados para que esta possa ser transformada em outra imagem e, posteriormente analisada (GÓRECKI *et al.*, 2006).

Softwares apropriados conduzem esta tarefa, os quais utilizam intervalos de tempo de retenção (Δt), que correspondem aos períodos de modulação P_M para segmentar os cromatogramas continuamente, formando assim cromatogramas secundários individuais (Figura 5B). Quando ocorre a injeção na segunda coluna, os tempos de retenção são marcados em t_1 , t_2 e t_3 , e tornam-se os tempos de retenção na 1ª dimensão para todos os picos secundários que eluem em um dado período de modulação (GÓRECKI *et al.*, 2006). O segundo tempo de retenção de cada pico é calculado como a diferença entre o tempo de retenção absoluto de um dado pico e o tempo de injeção, para um dado ciclo de modulação (HARYNUK *et al.*, 2002). Por exemplo, para o pico marcado com um asterisco na Figura 5A, o tempo de retenção na segunda dimensão é igual $t_x - t_1$ (GÓRECKI *et al.*, 2006).

Os cromatogramas individuais, obtidos na segunda dimensão, são alinhados lado a lado de acordo com os intervalos de tempo Δt , gerando assim um gráfico tridimensional como ilustrado na Figura 5C, onde o eixo x representa o tempo de retenção na primeira coluna, o eixo y o tempo de retenção na segunda coluna, e o eixo z a intensidade do sinal (GÓRECKI *et al.*, 2006).

Nesta representação, os picos secundários que pertencem ao mesmo composto são visualizados em diversos segmentos consecutivos, com tempos de

retenção idênticos na segunda coluna. Devido a esta característica, é possível recombinar os picos individuais gerados nos cromatogramas na segunda dimensão e converter a uma imagem (GÓRECKI *et al.*, 2006).

As matrizes de dados gerados (Figura 5C) são então convertidas em uma imagem através de *softwares* específicos, no qual cada pico reconstruído é caracterizado por dois tempos de retenção e intensidade do sinal, como mostra a Figura 5D (GÓRECKI *et al.*, 2006).

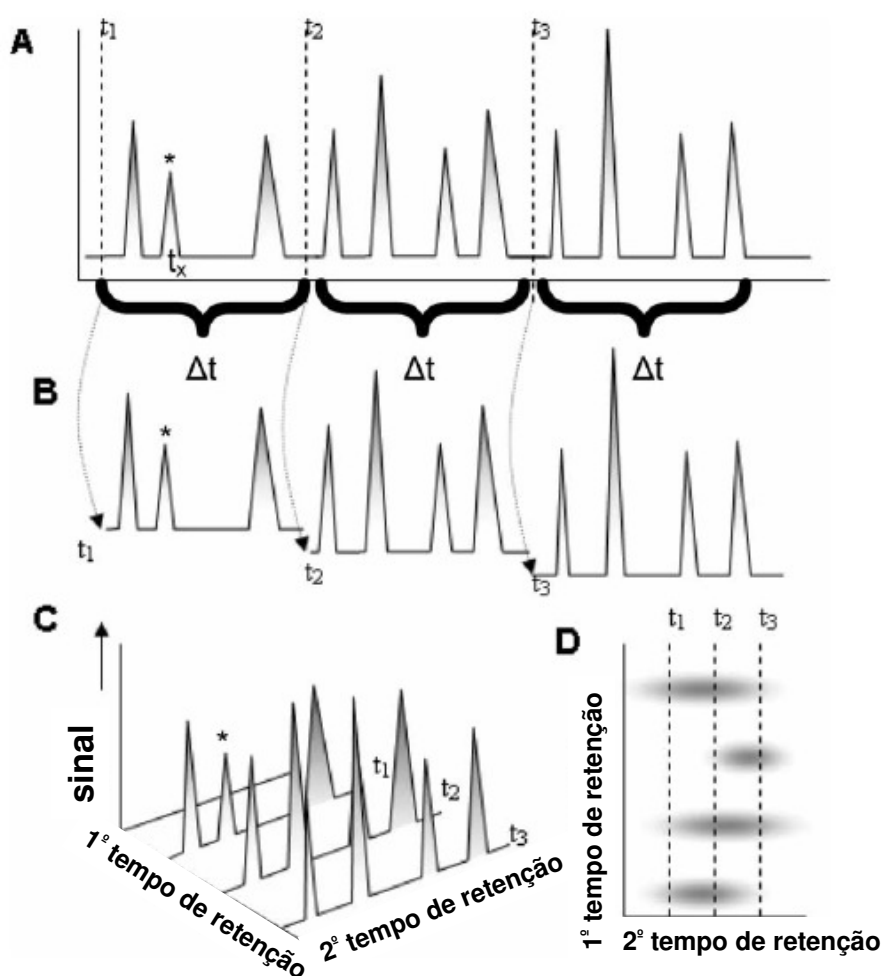


Figura 5. Geração e interpretação dos dados em GCxGC: (A) Cromatograma linear mono-dimensional, (B) separação do cromatograma inicial em segmentos, (C) alinhamento dos cromatogramas lado a lado gerando uma matriz de dados (D) transformação da matriz de dados em imagem (gráfico bidimensional), adaptado de GÓRECKI *et al.* (2006)

A imagem gerada pelos *softwares* permite a visualização do sinal analítico de diversas formas, como por exemplo, diagramas tridimensionais, diagramas de cores, diagramas de contorno, diagramas de bolhas e diagrama de ápices, os quais serão descritos brevemente a seguir. Neste trabalho, foram utilizados os diagramas de cores e de ápices para a visualização dos analitos no espaço de separação.

Diagrama tridimensional – gráfico tridimensional que representa uma separação bidimensional abrangente (DALLÜGE *et al.*, 2003). Neste diagrama, o eixo x representa o tempo de retenção na primeira dimensão, o eixo y o tempo de retenção na segunda dimensão e o eixo z a intensidade do sinal (MÜHLEN *et al.*, 2007a).

Diagrama de contorno (Figura 6A) – gráfico bidimensional que representa uma separação bidimensional abrangente, onde as intensidades de sinal semelhantes são conectadas por uma linha, resultando em uma forma geométrica, que representa uma vista superior de parte de um pico cromatográfico. Neste e nos próximos diagramas, o eixo x representa o tempo de retenção na primeira dimensão e o eixo y o tempo de retenção na segunda dimensão (MÜHLEN *et al.*, 2007a).

Diagrama de cores (Figura 6B) – gráfico bidimensional que representa uma separação bidimensional abrangente, onde as cores representam a intensidade do sinal detectado. A escala de cores mostra que a intensidade do sinal cromatográfico varia de mais intenso (cores próximas ao amarelo) ao menos intenso (cores próximas ao verde). Nesta imagem, cada mancha visualizada no diagrama de cores representa a vista superior de um pico cromatográfico em três dimensões (MÜHLEN *et al.*, 2007a).

Diagrama de bolhas (Figura 6C) – gráfico bidimensional que representa uma separação cromatográfica bidimensional abrangente, onde cada pico é representado por um círculo (MÜHLEN *et al.*, 2007a). A área de cada círculo correlaciona-se à medida quantitativa da soma das áreas dos picos modulados que geram o pico tridimensional (SHELLIE *et al.*, 2003). O centro de cada círculo representa as coordenadas de tempo em cada dimensão (MÜHLEN *et al.*, 2007a).

Diagrama de ápices (Figura 6D) – gráfico bidimensional que representa uma separação cromatográfica bidimensional abrangente, onde os máximos de

cada pico são representados por símbolos (MÜHLEN *et al.*, 2007a; SHELLIE *et al.*, 2003).

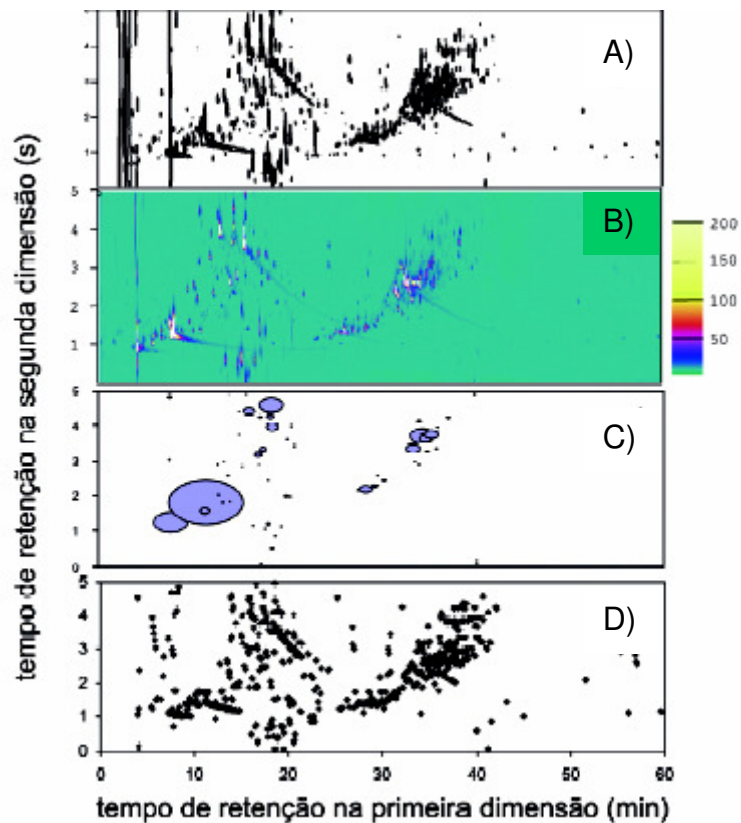


Figura 6. Diferentes representações para o espaço de separação de uma análise realizada por GC×GC para uma amostra de *Eucalyptus dunnii*, onde: A) diagrama de contorno, B) diagrama de cores, C) diagrama de bolhas e D) diagrama de ápices, adaptado de MÜHLEN *et al.* (2007a)

2.2 Pesticidas

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*) pesticida é definido como qualquer substância ou mistura de substâncias destinada a prevenir, destruir, repelir, ou mitigar eventuais pragas, as quais podem ser

insetos, ratos, outros animais, plantas indesejadas (ervas daninhas), fungos ou microorganismos, como bactérias e vírus (USEPA, 2007a).

O termo pesticida é usado para designar, de maneira geral, qualquer composto manufaturado a ser empregado na agricultura visando atender os objetivos acima citados, incluindo os inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, fumigantes, reguladores de crescimento, defolhantes, dessecantes, etc. (EMBRAPA, 2006).

O resíduo de pesticida é definido como sendo qualquer substância específica presente no alimento, “in natura” ou não, ou ainda em ração animal, proveniente do uso de pesticidas, como os produtos de conversão, metabólitos, produtos de reações e impurezas consideradas com alguma significância toxicológica. Este termo inclui resíduos de substâncias desconhecidas ou de fontes inevitáveis (como o meio ambiente), bem como o uso de produtos químicos conhecidos (FAO, 2005).

O Decreto Federal nº 4074, de 04 de janeiro de 2002, define como “agrotóxicos e afins” todos os “produtos e agentes de processos físicos, químicos e biológicos, destinados ao uso no setor de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, 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 defolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

A ampla utilização de pesticidas em plantações, trouxe para a sociedade aspectos positivos e negativos. A principal vantagem é o controle eficaz de pragas e de outros elementos nocivos às plantações, ocasionando a aceleração do crescimento da produção de alimentos, suprimindo assim grande parte da demanda mundial. Em contrapartida a este avanço, o uso descontrolado de pesticidas tem provocado à contaminação de águas, solos e alimentos. Este tipo de contaminação é a causa de problemas que comprometem a qualidade de vida tanto das pessoas que trabalham expostas aos pesticidas nas lavouras, bem como para o consumidor final, se estes alimentos estiverem contaminados, em níveis acima dos aceitáveis.

A importância dos pesticidas em garantir patamares elevados de produtividade das principais culturas, tem sido inquestionável. No entanto, existem questionamentos referentes ao meio ambiente e à saúde humana que têm preocupado a população mundial devido à utilização excessiva ou inadequada desses compostos (EMBRAPA, 2006).

Nas últimas décadas, o consumo de pesticidas no Brasil tem aumentado a taxas bem elevadas. Em 1964, o consumo total de pesticidas foi de 16 mil toneladas, enquanto em 1981 passou para 60 mil toneladas e, em 2000, para 140 mil toneladas. Isso representou um aumento no consumo de pesticidas de 276% entre 1964 e 1991 e de 176% entre 1991 e 2000 (EMBRAPA, 2006).

Devido à grande diversidade de produtos existentes (somente no Brasil são cerca de 500 produtos diferentes comercializados como agrotóxicos), os pesticidas podem ser classificados de diversas formas, como por exemplo, de acordo com a sua finalidade e poder tóxico (BARBOSA, 2004).

Quanto à finalidade os pesticidas podem ser classificados de acordo com o tipo de peste: algicidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas; inseticidas; moluscidas, nematocidas; ovicidas, rodenticidas, vampiricidas, entre outros (SANCHES, 2003; ANVISA, 2005).

A classificação quanto à toxicidade é fundamental, uma vez que diferentes tipos de intoxicação podem ser causados por pesticidas, os quais, por sua própria natureza, são compostos altamente perigosos para a saúde humana. Entretanto esse perigo varia muito de um composto para outro e os efeitos que eles, ou qualquer substância química, podem causar nos organismos vivos, incluindo o homem. Esses efeitos podem ser classificados em agudos ou crônicos (BARBOSA, 2004). O efeito agudo é observado após o contato com uma única dose do veneno. A magnitude desse efeito depende da toxicidade da substância, da dose, do tipo de contato e do organismo em particular (BARBOSA, 2004). O efeito crônico ocorre quando o organismo é exposto a pequenas doses de uma única substância potencialmente perigosa por um longo período de tempo. A ingestão de alimentos contaminados com resíduos de pesticidas é um exemplo de exposição que pode levar a efeitos crônicos sobre o sistema nervoso central, ou mesmo, câncer, dependendo do tipo de composto e da quantidade ingerida (BARBOSA, 2004).

No Brasil, a classificação toxicológica compreende quatro classes distintas de compostos, conforme apresentado na Tabela 1. Esta classificação obedece aos resultados de testes ou estudos realizados em laboratório, os quais buscam estabelecer os valores de DL₅₀ (dose letal mediana), ou seja, a dose a partir da qual se observa a morte de 50% dos animais de uma população expostos (BARBOSA, 2004). Na Tabela 1 estão listadas as diferentes classes toxicológicas de acordo com os valores de DL₅₀ e as cores correspondentes aos rótulos das formulações de pesticidas.

Tabela 1. Classificação dos pesticidas quanto à toxicidade

Classe	DL₅₀ (mg kg⁻¹)	Classificação	Cor da faixa no rótulo da embalagem
I	0-50	Extremamente tóxico	Vermelho vivo
II	50-500	Altamente tóxico	Amarelo intenso
III	500-5000	Mediamente tóxico	Azul intenso
IV	>5000	Pouco tóxico	Verde intenso

Fonte: LARINI, 1999

A regulamentação quanto ao uso dos pesticidas não está baseada somente no controle das classes químicas dos princípios ativos autorizados para uso como pesticidas, mas também no estabelecimento de um nível de referência, que corresponde à quantidade máxima aceita de resíduo de um determinado pesticida em cada alimento destinado ao consumo humano (NUNES & RIBEIRO, 1999).

Para garantir que a população não corra o risco de consumir alimentos com níveis perigosos de pesticidas, para todo produto registrado existe um limite máximo de resíduo (MRL, do inglês *Maximun Residue Limit*) permitido por lei para cada produto agrícola ou processado. Esses limites máximos são obtidos com

base em estudos realizados, seguindo-se as boas práticas agrícolas. (BARBOSA, 2004).

Em tese, o cumprimento destes MRL permite preservar a saúde do consumidor da ação tóxica dos pesticidas. Neste sentido, diversos organismos nacionais e internacionais estão encarregados de estabelecer tais limites.

No Brasil (2002) o Decreto nº 4074, os MRL foram definidos como sendo a “quantidade máxima de resíduos de agrotóxico ou afim oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde a produção até o consumo, expressa em partes (em peso) do agrotóxico, afim ou seus resíduos por partes de alimento (em peso) (ppm ou mg kg^{-1})”.

O MRL é definido pelo *Codex Alimentarius*, como sendo a concentração máxima do resíduo de um pesticida (expresso em mg kg^{-1}) recomendado pelo comitê do *Codex Alimentarius* sobre resíduos de pesticidas (CCPR, do inglês *Codex Alimentarius Committe on Pesticides Residues*) como sendo legalmente permitido no alimento ou na ração animal. Em geral, o assessoramento científico dos organismos internacionais tem sido efetuado pelo JMPR (do inglês, *Joint FAO/WHO Meeting on Pesticides Residues*) (FAO, 2005).

Um parâmetro importante para a determinação dos MRL é a chamada Ingestão Diária Aceitável (IDA), que corresponde à quantidade do pesticida que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida do indivíduo, sem que isso cause risco apreciável à sua saúde. Com base nos valores de IDA e, considerando a dieta média dos indivíduos de uma sociedade, os especialistas calculam os valores de limites máximos permitidos de resíduos dos diversos pesticidas e outros produtos químicos em alimentos e água (BARBOSA, 2004). Portanto, os valores de MRL e IDA estão interligados, de modo a assegurar que os pesticidas utilizados não apresentem riscos à saúde dos consumidores.

2.2.1 Pesticidas piretróides selecionados para determinação em uva

O monitoramento de pesticidas é de grande importância para o comércio exterior, já que uma grande parte da produção agrícola brasileira é destinada às exportações. Tanto para o setor vitícola como para o de frutas, com relação às

exportações brasileiras, a uva de mesa é o principal produto. As exportações desta cultura continuam em ritmo crescente, em 2006 foram exportadas 62,250 mil toneladas de uvas, sendo observado um aumento de 21,5% em relação ao ano anterior (EMBRAPA, 2007).

Os piretróides fazem parte de um grupo relativamente novo de pesticidas usados amplamente na agricultura em uma variedade de frutas e vegetais para o controle de insetos (SANNINO *et al.*, 2003). Estes pesticidas são compostos sintéticos que agem de maneira similar as piretrinas, as quais são derivadas naturalmente das flores de crisântemo (USEPA, 2007b). O uso destes inseticidas tem aumentado rapidamente desde o desenvolvimento do primeiro piretróide fotoestável em 1973 (SANNINO *et al.*, 2003), devido a sua eficácia em doses baixas, curta persistência em termos ambientais, e relativamente baixa toxicidade quando comparado aos organofosforados, organoclorados e carbamatos (CHEN & WANG, 1996). Experimentos toxicológicos executados provaram que os metabólitos dos piretróides são atóxicos ou de baixa toxicidade (COLUMÉ *et al.*, 2001).

Outra vantagem destes pesticidas é que eles admitem a sinergia, ou seja, a potencialização pela adição de outra substância, gerando um aumento na eficácia. Além disso, são os compostos de mais rápida ação na interferência da transmissão de impulsos nervosos podendo possuir efeito repelente, espantando os insetos ao invés de eliminá-los (SANCHES, 2003; ANVISA, 2005). Os piretróides sintéticos têm boa estabilidade sob luz e temperatura ambiente. Degradam-se por hidrólise e oxidação, sendo caracterizados também pela rápida degradação por microrganismos presentes no meio ambiente (SANCHES, 2003; ANVISA, 2005).

Devido os piretróides serem o maior grupo de inseticidas amplamente utilizados no mundo, a determinação dos resíduos destes pesticidas em *commodities*, alimentos e matrizes ambientais é necessária para monitorar e regulamentar o seu uso (SANNINO, 2003). Na Figura 7 estão representadas as fórmulas estruturais dos pesticidas selecionados para este estudo.

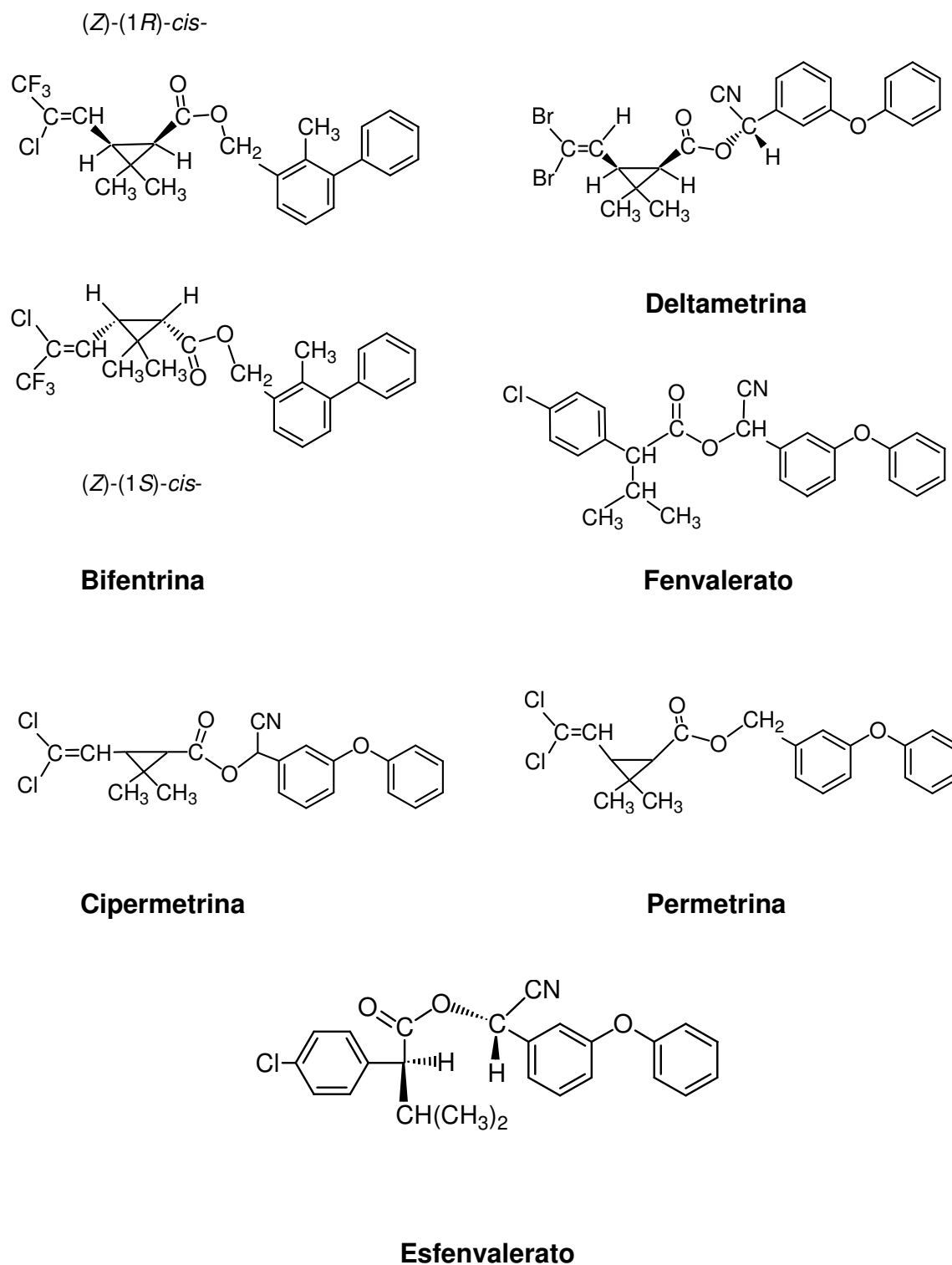


Figura 7. Fórmulas estruturais dos pesticidas selecionados para determinação em uva

Na Tabela 2 estão listados os valores de MRL estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2007), *Codex Alimentarius* (2007) e pela União Européia (2007) para os compostos determinados na uva.

Tabela 2. Pesticidas analisados e Limites Máximos de Resíduos (MRL)

Pesticida	MRL (mg kg ⁻¹)		
	ANVISA	Codex Alimentarius	União Européia
Bifentrina	0,1	n.e.	0,2
Cipermetrina	n.e.	n.e.	0,5
Deltametrina	n.e.	0,2	0,1
Fenvalerato ^a	n.e.	n.e.	0,02
Permetrina ^b	n.e.	2,0	0,05

n.e. = não estabelecido, a = soma dos isômeros esfenvalerato e fenvalerato; b = soma dos isômeros cis e trans

2.3 Preparo de amostra para análises de resíduos de pesticidas

O preparo da amostra é a etapa crucial dentro de um método analítico, principalmente quando se tratam de amostras sólidas ou semi-sólidas, tais como amostras ambientais e de alimentos, as quais geralmente não podem ser analisadas sem uma etapa prévia de preparo da amostra, devido aos baixos níveis de concentração em que os analitos estão presentes nestas matrizes (KRISTENSSON, 2005).

Os procedimentos de preparo de amostra, tais como extração, concentração e *clean-up*, influenciam potencialmente na confiabilidade e exatidão das análises (AHMED, 2001). Nos últimos anos, muitas inovações nos processos analíticos que podem ser aplicados no preparo de amostras ambientais e alimentos para extração e determinação de resíduos de pesticidas, têm sido desenvolvidos (PICÓ *et al.*, 2007).

Devido aos baixos limites de detecção exigidos pelas agências reguladoras e a natureza complexa das matrizes nas quais os compostos de interesse estão presentes, eficiência no preparo da amostra, detecção e quantificação a níveis traços são aspectos importantes para métodos analíticos (TORRES *et al.*, 1996).

2.3.1 Métodos de extração para análises de resíduos de pesticidas

Métodos clássicos, tais como Extração Líquido-Líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) e Extração por Soxhlet, para a determinação de poluentes a nível de traços em amostras ambientais são geralmente procedimentos que envolvem inúmeras etapas tipicamente baseada na extração exaustiva da matriz e a subsequente remoção do material co-extraído por sucessivas etapas de *clean-up* anterior a análise. Tal preparo da amostra envolve uma grande quantidade de amostra, sorvente (s), alta qualidade dos solventes orgânicos e requer muito trabalho manual para a obtenção dos extratos. Ou seja, esses métodos são dispendiosos em termos de tempo e consumo de material, desta forma o desenvolvimento de procedimentos, rápidos, mais efetivos e ambientalmente corretos são necessários (KRISTENSSON, 2005).

Recentemente, muitas técnicas de extração tais como Extração por Fluido Supercrítico (SFE, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*), Extração Assistida por Microondas (MAE, do inglês *Microwave-Assisted Extraction*) e Extração por Líquido Pressurizado (PLE, do inglês *Pressurised Liquid Extraction*) têm sido desenvolvidas na tentativa de superar as principais limitações dos métodos convencionais, como tempo de extração e consumo de solventes orgânicos. Em geral, estas técnicas alternativas permitem uma extração mais eficiente para os analitos presentes na matriz, devido ao maior contato do solvente de extração com os analitos de interesse (KRISTENSSON, 2005).

Procedimentos de Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*) têm sido amplamente utilizados para análises de resíduos de pesticidas em amostras ambientais e de alimentos, os quais incluem várias abordagens, tais como Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSDP, do inglês *Matrix Solid-Phase Dispersion*), Micro-Extração em Fase Sólida (SPME, do inglês

Solid-Phase Micro-Extraction) e Extração Sortiva por Barra de Agitação (SBSE, do inglês *Stir-Bar Sorptive Extraction*). Estes métodos de extração representam uma possibilidade de redução do tempo de análise, consumo de solvente e diminuição de custos (PICÓ *et al.*, 2007).

Atualmente, os métodos multirresíduos mais comumente utilizados para as análises de pesticidas em frutas e vegetais, envolvem uma extração inicial com acetona, acetonitrila, ou acetato de etila, a partir da qual os analitos de interesse são transferidos para uma camada orgânica, deixando na fase aquosa os co-extrativos indesejáveis e alguns pesticidas altamente polares (SHERMA, 2001; HIEMSTRA & KOK, 2007).

2.3.1.1 Método de extração Luke

O método Luke é a base dos métodos multirresíduos de pesticidas mais frequentemente usados para o monitoramento de alimentos, estudos de avaliação de riscos e análises de rotina em amostras não gordurosas, tais como frutas e vegetais (SHERMA, 2001). Este método consiste em uma extração inicial dos pesticidas com acetona seguida de uma partição líquido-líquido com solventes apolares, éter de petróleo e diclorometano, logo após adiciona-se cloreto de sódio para remover a água co-extraída (SCHENK *et al.*, 2002), forçando assim com que os pesticidas polares presentes na fase aquosa, sejam conduzidos para a fase orgânica (DIÉZ *et al.*, 2006).

Na década de 80, o ministério da agricultura na Holanda (VWA, *Food and Consumer Product Safety Authority*) desenvolveu em seu laboratório o método de extração mini-Luke, o qual é uma miniaturização do método de extração Luke original (LUKE *et al.*, 1975), omitindo-se a etapa de particionamento com cloreto de sódio. Este método de extração é o mais rápido disponível atualmente em análises de rotina de pesticidas em laboratórios, e tem mostrado bons resultados de recuperação para uma grande variedade de pesticidas em diversas matrizes (HIEMSTRA & KOK, 2007).

As maiores vantagens deste método de extração, além da velocidade, é a limpeza relativa dos extratos, embora não seja aplicada uma etapa de *clean-up*, e

a compatibilidade com a maioria dos detectores comumente usados para análises de pesticidas. Além disso, a miniaturização deste método possibilitou a redução da quantidade de amostra bem como de solventes utilizados. Entretanto, valores baixos de recuperação foram obtidos para pesticidas polares, como metamidofós, ometoato, monocrotofós entre outros (HIEMSTRA & KOK, 2007).

Como um método de extração alternativo, desenvolveu-se no VWA uma modificação do método de extração mini-Luke nos anos 90, onde se adicionou sulfato de sódio na etapa de extração, levando assim, a uma melhor extração dos pesticidas polares e conseqüentemente, melhores valores de recuperações foram obtidos para estes pesticidas (HIEMSTRA & KOK, 2007).

2.3.1.2 Método de acetato de etila

KRIJGSMAN *et al.* (1976), introduziram o método de acetato de etila como uma alternativa, a fim de substituir o método Luke para extração de amostras não gordurosas devido a sua maior rapidez, simplicidade, limpeza dos extratos e bons valores de recuperação. Todas as vantagens deste método fizeram dele o método de extração oficial adotado por algumas agências reguladoras européias (DIÉZ *et al.*, 2006).

O método de acetato de etila envolve uma extração com acetato de etila com uma subseqüente adição de Na_2SO_4 e uma etapa de *clean-up* utilizando Cromatografia por Permeação em Gel (GPC, do inglês *Gel Permeation Chromatography*) ou florisil. Este método não somente aumentou a extração de compostos polares, quando comparado ao método Luke, mas também aumentou a quantidade de interferentes polares extraídos da matriz (DIÉZ *et al.*, 2006).

2.3.1.3 Método QuEChERS

ANASTASSIADES *et al.* publicaram em 2003 um método provido com resultados de alta qualidade com um número mínimo de etapas e um baixo consumo de solvente. Ao método foi atribuída a sigla QuEChERS (do inglês

Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe), a qual reflete as suas maiores vantagens (rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro).

Este método envolve uma extração inicial com acetonitrila, seguida por uma etapa de partição líquido-líquido após adição de uma mistura de sais anidros (MgSO_4 e NaCl), os quais facilitam a remoção de uma quantidade significativa de componentes polares da matriz (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Finalmente, uma etapa simples de purificação denominada extração em fase sólida dispersiva (SPE) é efetuada, onde um sorvente amina primária secundária (PSA, do inglês *Primary Secondary Amine*) é adicionado diretamente ao extrato da matriz (MASTOVSKA & LEHOTAY, 2004).

A principal desvantagem do método QuEChERS, comparado a outros métodos de extração, é que a relação amostra:extrato final, de 1 g mL^{-1} , é mais baixa do que $2\text{-}5 \text{ g mL}^{-1}$ obtido pela maioria dos métodos tradicionais. (LEHOTAY *et al.*, 2005). Portanto, se a matriz não for uma fonte limitante de ruído nas análises, isto pode conduzir a uma redução de sensibilidade.

2.4 Validação de métodos cromatográficos para a determinação de pesticidas em uva

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida (RIBANI *et al.*, 2004). Para garantir que um método analítico novo assegure informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada validação (RIBANI *et al.*, 2007).

Validação é o ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal (LANÇAS, 2004). A validação do método analítico envolve um procedimento o qual prova que o método fornece os resultados esperados com credibilidade, precisão e exatidão adequadas (LANÇAS, 2004).

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento (RIBANI *et al.*, 2004). Conseqüentemente, antes de um método

analítico ser implementado para análises de rotina, ele deve primeiramente ser validado para demonstrar que é adequado para seu uso pretendido (ROZET *et al.*, 2007).

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais e internacionais (RIBANI *et al.*, 2007). Infelizmente, algumas definições são diferentes entre as diversas organizações (RIBANI *et al.*, 2004), sendo assim, um grande esforço no sentido de harmonizar guias para recuperação de informação em medidas analíticas foi efetuado por intermédio de trabalho em conjunto entre grupos do sistema ISO (do inglês *International Standardization Organization*), IUPAC (do inglês *International Union of Pure Applied Chemistry*) e AOAC (do inglês *Association of Official Analytical Chemists*) (LANÇAS, 2004).

Neste trabalho, os parâmetros utilizados para a validação de método analítico foram: curva analítica e linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão, os quais foram avaliados seguindo as orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos estabelecidos pelo INMETRO. Atualmente, é praticamente consenso entre muitos laboratórios, que as soluções analíticas dos pesticidas devem ser preparadas em extrato da matriz ao invés de em solventes puros, a menos de que se tenha sido provada a insignificância do efeito matriz. Desta forma, é de suma importância avaliar este efeito, uma vez que este pode influenciar nos resultados das análises (PRESTES, 2007).

2.4.1 Curva analítica e linearidade

A resposta para um procedimento analítico corresponde à relação, dentro de uma faixa específica, entre a resposta (sinal, área, altura do pico, absorção) e a concentração (quantidade) do analito na amostra (ROZET *et al.*, 2007). Neste trabalho a resposta adotada será área do pico.

Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse, deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações

conhecidas dessa espécie (AUGUSTO *et al.*, 2004). Essa relação matemática muitas vezes, pode ser expressa por uma equação de reta chamada curva de analítica, a qual é geralmente aceita com um mínimo de 5 pontos (NETO *et al.*, 2002; LANÇAS, 2004).

A linearidade refere-se à relação entre a quantidade introduzida no instrumento e a quantidade calculada a partir da curva de analítica, a qual relaciona a resposta instrumental e a concentração (ROZET *et al.*, 2007). A equação de regressão linear (Equação 1) que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b \quad \text{Equação (1)}$$

onde:

y = resposta medida (área do pico);

x = concentração;

a = inclinação da curva analítica = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y, quando x = 0

Além dos coeficientes a e b, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r, o qual fornece uma estimativa da qualidade da curva analítica obtida (CHUI *et al.*, 2001). A regressão linear deve ter alto coeficiente de determinação ($r^2 > 0,999$) (PIMENTEL & NETO, 1996), ou de correlação ($r > 0,99$) (ANVISA, 2003) ou $> 0,9$ (INMETRO, 2003), o que evidencia um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão.

2.4.2 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Em análises onde são realizadas determinações na faixa de concentração de traços e ultra-traços de analitos é imprescindível que, medidas sejam feitas na região do LOD e LOQ (RIBANI *et al.*, 2007).

O limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (ICH, 1995; INMETRO, 2003). O LOD pode ser calculado por diferentes métodos, sendo o método baseado na relação sinal:ruído mais comumente utilizado, porém este método somente pode ser aplicado em sistemas analíticos que apresentam ruído para a linha base (RIBANI *et al.*, 2007).

O limite de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*) é o menor valor de concentração em que o analito pode ser quantificado com certo limite de confiança, ou seja, abaixo deste valor medições não apresentam suficiente confiança para quantificação (THOMPSON *et al.*, 2002). O método para determinação do LOQ deve ser considerado com a incerteza da medida de um componente dentro de um intervalo linear (RIBANI *et al.*, 2007).

Estes limites são estabelecidos por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito. O LOD e o LOQ são geralmente expressos em unidades de concentração (BRASIL, 2003; FRANCOTTE *et al.*, 1996).

O LOD e o LOQ foram estabelecidos com base na Figura 8, onde o LOD corresponde a 3 vezes o ruído da linha de base e o LOQ corresponde à concentração que produz uma relação sinal:ruído superior a 10.

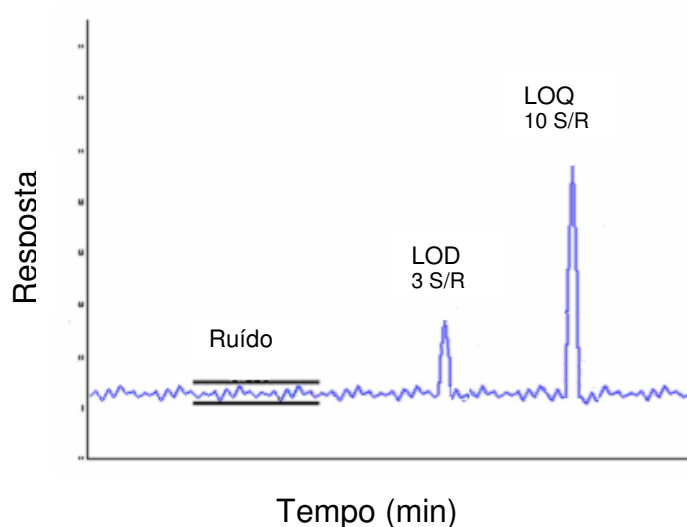


Figura 8. Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de LOD e LOQ

2.4.3 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (INMETRO, 2003). A precisão em validação de métodos pode ser considerada em três níveis diferentes: repetitividade (medidas em um mesmo dia), precisão intermediária (medidas realizadas ao longo de vários dias) e reprodutibilidade (medidas realizadas em laboratórios diferentes) (RIBANI *et al.*, 2004).

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; com repetições efetuadas em um curto intervalo de tempo (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou analistas, ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores (ICH, 1995). Recomenda-se, para o cálculo da precisão intermediária, um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003). O objetivo da precisão intermediária na validação é verificar que, no mesmo laboratório, o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI *et al.*, 2004).

Ambas repetitividade e precisão intermediária podem ser expressas através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*) (RIBANI *et al.*, 2004), sendo que, em métodos de análises de traços, são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (HUBER, 1998).

O valor numérico usado para avaliar a precisão, RSD, pode ser calculado através da Equação (2) (CAUSON, 1997; GARP, 1999).

$$\text{RSD} = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

onde:

s = estimativa de desvio padrão absoluto

$$s = \{\sum(x_i - x_m)^2 / N - 1\}^{1/2}$$

x_i = valores individuais

x_m = média das medidas em replicatas

N = número de medidas.

2.4.4 Exatidão

Exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência, aceito como convencionalmente verdadeiro. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência) (INMETRO, 2003).

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão são entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação.

Quando materiais de referência não estão disponíveis, a exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de recuperação (CODEX ALIMENTARIUS, 2001), os quais são geralmente expressos em percentual.

A recuperação dos analitos pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas desta. As amostras devem ser fortificadas com os analitos em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. A limitação desse procedimento é a de que o analito adicionado não está

necessariamente na mesma forma que se apresenta na amostra (INMETRO, 2003).

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análises de resíduos, geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ (GARP, 1999), inclusive para análise de resíduos de pesticidas (HUBER, 1998).

2.4.5 Efeito matriz

O efeito matriz é observado quando uma considerável diferença de resposta é obtida entre padrões preparados no solvente e aqueles preparados no extrato da matriz, com boa precisão. Uma das maneiras de minimizar e/ou eliminar este efeito é reduzir a quantidade de componentes da matriz que co-eluem com os analitos no detector, para isto, métodos de extração mais seletivos e etapas mais eficientes de *clean-up* devem ser desenvolvidos. Contudo alternativas, como por exemplo, a calibração externa realizada em extrato da matriz idêntica ou similar ao da amostra é geralmente utilizada (PICÓ *et al.*, 2004).

Entre as diversas maneiras utilizadas para compensar o efeito matriz em GC, podemos citar: 1) uso do método da adição padrão; 2) uso de padrão interno deuterado; 3) preparo das soluções analíticas no extrato da matriz (*matrix matched standards*), entre outras alternativas (PICÓ *et al.*, 2004).

O efeito matriz pode ser calculado conforme a Equação 3. Desta forma, as áreas obtidas das soluções analíticas preparadas em solvente e no extrato da matriz são comparadas.

$$EfeitoMatriz\% = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

onde:

X_1 = Média das áreas da solução analítica de cada pesticida, preparada em extrato da matriz, numa dada concentração;

X_2 = Média das áreas da solução analítica de cada pesticida, preparada em solvente, numa dada concentração.

Assim, verifica-se se a matriz exerce efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal) sobre o resultado da análise. Quando o resultado for acima de 10% considera-se que o efeito matriz começa a exercer influência nas análises (HAJSLOVÁ & ZROSTLÍKOVÁ, 2003).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu em duas etapas: desenvolvimento de um novo modulador fixo a ar comprimido e avaliação do processo de modulação utilizando alcanos e pesticidas e análise por GC×GC-FID; e aplicação deste modulador na avaliação do método mini-Luke modificado para extração de pesticidas fortificados em uva, sendo em seguida submetidos à análise por GC×GC- μ ECD.

Este trabalho foi desenvolvido em Amsterdã (Holanda) no laboratório *Analytical Chemistry & Applied Sciences (ACAS)* na *Free University*, com o apoio do laboratório do *Food and Consumer Product Safety Authority (VWA)*.

3.1 Instrumentação utilizada na avaliação do novo modulador e condições instrumentais empregadas para as análises realizadas por GC×GC-FID

- Sistema GC×GC-FID: Cromatógrafo a gás HP 6890 GC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipado com:
 - ✓ Amostrador automático série HP 7673;
 - ✓ Injetor *split/splitless*, com insensor de vidro silanizado, d.i. 4 mm;
 - ✓ 1ª coluna capilar VF-5 (5% fenil 95% metilpolisiloxano), de sílica fundida, 30 m de comprimento, 0,25 mm de d.i. e 0,25 μ m de espessura de filme (Varian, Holanda);
 - ✓ 2ª coluna capilar Carbowax (polietileno glicol), 0,4 m de comprimento, 0,1 mm de d.i. e 0,1 μ m de espessura de filme (Agilent, Holanda);
 - ✓ Modulador com duplo jato de ar comprimido (desenvolvido no laboratório);
 - ✓ Detector por Ionização de Chama (Agilent Technologies)
 - ✓ Sistema de aquisição de dados através do *software* HP *Chemstation* (Agilent, Revision - A.07.01) para integração dos picos; *2D Converter Program* (beta version 1.0, Gerard Sharp) para

converter a matriz de dados em imagem e *software Transform* (version 3.4, Fortner software) foi utilizado para visualizar a imagem na forma de diagramas.

- Modo de injeção: *splitless*;
- Injeção realizada com o auxílio de amostrador automático;
- Temperatura do injetor: 280 °C;
- Volume de injeção: 1 µL;
- Programação de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 100 °C com incremento de temperatura de 3 °C min⁻¹ até 320 °C;
- Vazão do gás de arraste (hélio) constante em 0,5 mL min⁻¹ na coluna;
- Tempo de modulação: 3,5 s;
- Tempo total de corrida cromatográfica: 73 min;
- Temperatura do detector FID: 300 °C;
- Velocidade de aquisição dos dados pelo FID: 100 Hz;
- Vazão dos gases no detector: hidrogênio 30 mL min⁻¹, ar sintético 300 mL min⁻¹ e gas *make up* (nitrogênio) 15 mL min⁻¹.

3.2 Instrumentação utilizada para aplicação do modulador desenvolvido na validação de método analítico e condições instrumentais empregadas para as análises realizadas por GC×GC-µECD

- Sistema GC×GC-µECD: Cromatógrafo a gás HP 6890 GC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipado com:
 - ✓ Amostrador automático série HP 7673;
 - ✓ Injetor *split/splitless*, com insensor de vidro silanizado, d.i. 4 mm;
 - ✓ 1^a coluna capilar VF-5 (5% fenil 95% metilpolisiloxano), de sílica fundida, 30 m de comprimento, 0,25 mm de d.i. e 0,25 µm de espessura de filme (Varian, Holanda);
 - ✓ 2^a coluna capilar VB-50 (50% metilpolisiloxano 50% fenilpolisiloxano), de sílica fundida, 0,5 m de comprimento, 0,1 mm de d.i. e 0,1 µm de espessura de filme (Valco Bond, Holanda);

- ✓ Modulador com duplo jato de ar comprimido (desenvolvido no laboratório);
 - ✓ Micro Detector por Captura Elétrons (μ ECD) com volume de célula de 150 μ L (Agilent Technologies);
 - ✓ Sistema de aquisição de dados através do *software* HP *Chemstation* (Agilent, Revision - A.07.01) para integração dos picos; *2D Converter Program* (beta version 1.0, Gerard Sharp) para converter a matriz de dados em imagem e *software Transform* (version 3.4, Fortner software) foi utilizado para visualizar a imagem na forma de diagramas;
-
- Modo de injeção: *splitless*;
 - Injeção realizada com o auxílio de amostrador automático;
 - Temperatura do injetor: 280 °C;
 - Volume de injeção: 1 μ L;
 - Programação de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 80 °C com incremento de temperatura de 20 °C min^{-1} até 200 °C; posteriormente de 5 °C min^{-1} até 300 °C;
 - Vazão do gás de arraste (hélio) constante em 1,0 mL min^{-1} na coluna;
 - Tempo de modulação: 5 s;
 - Tempo total de corrida cromatográfica: 26 min;
 - Temperatura do detector μ ECD: 300 °C;
 - Velocidade de aquisição dos dados pelo μ ECD: 50 Hz;
 - Vazão do gás no detector: gás *make up* (nitrogênio) 60 mL min^{-1} .

3.3 Equipamentos

- Sistema de purificação de água Milli-Q[®] - resistividade 18,2 $\text{M}\Omega \text{ cm}$ (MilliPore[®], EUA);
- Balança analítica de precisão com 4 casas decimais (Sartorius, Alemanha);
- Balança analítica com 2 casas decimais (Sartorius, Alemanha);
- Lavadora automática de vidrarias G 7883 CD (Miele, EUA);

- Banho de ultrassom M3510 DHT (Branson, México);
- Banho de água MP Basis (Julabo, Alemanha);
- Homogeneizador ultraturrax Polytron® PT 6000 (Polytron, Suíça);
- Centrífuga Harrier 18/80, refrigerada (MSE, Inglaterra).

3.4 Gases

- Gases utilizados no sistema GC×GC-FID:
 - ✓ Gás de arraste: hélio 99,999% de pureza (Praxair, Holanda)
 - ✓ Gás *make up*: nitrogênio 99,999% de pureza (Praxair, Holanda)
 - ✓ Hidrogênio: 99,999% de pureza (Praxair, Holanda)
 - ✓ Ar sintético: 99,999% de pureza (Praxair, Holanda)
- Gases utilizados no sistema GC×GC-μECD:
 - ✓ Gás de arraste: hélio 99,9999% de pureza (Praxair, Holanda);
 - ✓ Gás *make up*: nitrogênio 99,999% de pureza (Praxair, Holanda).

3.5 Reagentes, Solventes e Materiais

- Acetato de etila, grau pesticida (Lab-scan Analytical Science, Irlanda);
- Diclorometano, éter de petróleo, metanol, acetona, sulfato de sódio anidro, todos grau pesticida, (Merck, Alemanha);
- Padrões sólidos dos pesticidas (Tabela 3 e 4);
- Padrões de alcanos lineares de C₇ a C₂₉ (exceto C₁₅, C₁₆, C₁₉, C₂₆ e C₂₇), (Polyscience Corporation (PSC));
- Amostras de uva (cultivar Itália) fornecidas pelo VWA;
- Dispensador Optifix, capacidade 50 mL (GS, Alemanha);
- Pipetador *hand step*® (Brand, Alemanha);
- Seringas de volumes de 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 μL (Hamilton, Suíça);
- Tubos de teflon com tampa, capacidade de 250 mL fabricados sob medida (Holanda);
- Vidrarias comuns de laboratório.

3.6 Pesticidas selecionados

Os pesticidas selecionados para este estudo estão listados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente para análises por GC×GC-FID e GC×GC- μ ECD, com sua pureza e fornecedores.

Para a avaliação do modulador empregando o sistema GC×GC-FID, foram utilizados os pesticidas listados na Tabela 3.

Tabela 3. Pesticidas analisados por GC×GC-FID

Pesticida	Fornecedores	Grau de pureza (%)
Bifentrina	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	98,0
Ciflutrina	Riedel-de Haën (Alemanha)	98,0
Cipermetrina	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	91,5
Esfenvalerato	Riedel-de Haën (Alemanha)	99,9
Fenitrotiona	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	97,0
Fipronil	Riedel-de Haën (Alemanha)	96,7
Permetrina cis	Zeneca (Estados Unidos)	99,4
Permetrina trans	Zeneca (Estados Unidos)	96,4
Trifloxistrobina	Novartis (Estados Unidos)	99,9
Trifluralina	Riedel-de Haën (Alemanha)	99,3

Para a aplicação do modulador na validação de método analítico empregando o sistema GC×GC- μ ECD, foram utilizados os pesticidas listados na tabela 4.

Tabela 4. Pesticidas analisados por GC×GC-μECD

Pesticida	Fornecedores	Grau de pureza (%)
Bifentrina	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	98,0
Cipermetrina	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	91,5
Deltametrina	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	98,5
Esfenvalerato	Riedel-de Haën (Alemanha)	99,9
Fenvalerato	Riedel-de Haën (Alemanha)	99,8
Permetrina cis	Zeneca (Estados Unidos)	99,4
Permetrina trans	Zeneca (Estados Unidos)	96,4

3.7 Preparo das soluções analíticas

3.7.1 Soluções analíticas utilizadas na avaliação do novo modulador

Preparou-se uma solução na concentração de 30 mg L⁻¹ de uma mistura contendo alcanos de C₇ a C₂₉ (exceto C₁₅, C₁₆, C₁₉, C₂₆ e C₂₇) em hexano.

Para o preparo das soluções analíticas “estoque” dos pesticidas, efetuou-se o cálculo para determinar a quantidade de cada padrão sólido puro a ser pesado, para obter-se soluções individuais de cada composto na concentração de 1000 mg L⁻¹. Para isso, os padrões sólidos foram pesados individualmente, diretamente dentro de frascos âmbar (tampa contendo batoque de politetrafluoretileno (PTFE)), com capacidade de 20 mL, sendo em seguida, dissolvidos em tolueno, e homogeneizados por 5 minutos em banho de ultrassom. Estas soluções “estoques” apresentam estabilidade de cerca de 8 anos, desde que armazenadas em freezer, a -20 °C, e corretamente manipuladas (PRESTES, 2007).

Em seguida preparou-se 20 mL de uma mistura de concentração 50 mg L⁻¹ contendo todos os pesticidas a serem estudados. Para isso, transferiu-se 1 mL de cada solução “estoque” para balão volumétrico de 20 mL já contendo um pequeno volume de tolueno, sendo posteriormente, o volume completado com este mesmo

solvente. Esta solução foi armazenada em frasco âmbar (tampa contendo batoque de PTFE), com capacidade de 20 mL.

A partir da solução de 50 mg L^{-1} preparou-se 50 mL de uma solução de concentração 5 mg L^{-1} , para isso, transferiu-se 5 mL desta solução para balão volumétrico de 50 mL, já contendo um pequeno volume de metanol, sendo, posteriormente, o volume completado com este mesmo solvente. A solução intermediária de 5 mg L^{-1} , foi armazenada em frasco âmbar (tampa contendo batoque de PTFE), com capacidade de 50 mL.

Essa solução intermediária foi utilizada para preparar as soluções analíticas, através de sua diluição, nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 mg L^{-1} , para o estudo de linearidade e confecção das curvas analíticas, de cada composto. Todas as soluções analíticas foram preparadas em solvente orgânico (metanol). Em seguida foram transferidos 250 μL destas soluções analíticas para frascos de 2 mL para amostrador automático e adicionou-se 10 μL da solução contendo uma mistura de alcanos na concentração de 30 mg L^{-1} anteriormente preparada.

Todas as soluções analíticas foram armazenadas em freezer a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo que antes de serem utilizadas foram retiradas do freezer e deixadas atingir a temperatura ambiente para homogeneização.

3.7.2 Soluções analíticas utilizadas para aplicação do modulador na validação de método analítico

Para o preparo das soluções analíticas “estoques”, efetuou-se o cálculo para determinar a quantidade de cada padrão sólido puro a ser pesado, para obter-se soluções individuais de cada composto na concentração de 1000 mg L^{-1} . Para isso, os padrões sólidos foram pesados individualmente, diretamente dentro de frascos âmbar (tampa contendo batoque de PTFE), com capacidade de 20 mL, sendo em seguida, dissolvidos em tolueno, e homogeneizados por 5 minutos em banho de ultrassom.

Em seguida foi preparada 10 mL de uma mistura de concentração 100 mg L^{-1} contendo todos os pesticidas a serem estudados. Para isso, transferiu-se 1 mL

de cada solução “estoque” para balão volumétrico de 10 mL já contendo um pequeno volume de acetato de etila, sendo posteriormente, o volume completado com este mesmo solvente. Esta solução foi armazenada em frasco âmbar (tampa contendo batoque de PTFE), com capacidade de 20 mL.

A partir da solução de 100 mg L^{-1} preparou-se 20 mL de uma solução de concentração 10 mg L^{-1} , para isso, transferiu-se 2 mL desta solução para balão volumétrico de 20 mL, já contendo um pequeno volume de acetato de etila, sendo, posteriormente, o volume completado com este mesmo solvente. A solução intermediária de 10 mg L^{-1} , foi armazenada em frasco âmbar (tampa contendo batoque de PTFE), com capacidade de 20 mL.

Essa solução intermediária foi utilizada para os ensaios de fortificação e também para preparar as soluções analíticas, através de sua diluição, nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,5 mg L^{-1} , para o estudo de linearidade e confecção das curvas analíticas, de cada composto. Todas as soluções analíticas foram preparadas tanto em solvente orgânico (acetato de etila) como no extrato da matriz (uva). Dessa maneira, pôde-se avaliar o efeito da matriz durante as análises, que será discutido no item 3.9.5. As soluções analíticas nas concentrações de 0,02, 0,05 e 0,5 mg L^{-1} , correspondem aos níveis de fortificação de 0,02, 0,05 e 0,5 mg kg^{-1} , respectivamente.

Todas as soluções analíticas foram armazenadas em freezer a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo que antes de serem utilizadas foram retiradas do freezer e deixadas atingir a temperatura ambiente para homogeneização.

A identificação foi realizada através da injeção de cada pesticida separadamente e a integração das áreas dos picos para a quantificação dos pesticidas foi realizada usando o *software* HP *Chemistation*.

3.8 Análise dos solventes e reagentes pelo método de extração mini-Luke modificado

Este procedimento tem a finalidade de verificar a pureza dos solventes e reagentes utilizados, com relação às contaminações com resíduos dos pesticidas estudados. Consiste em realizar todo o procedimento normal de extração das

amostras, porém sem a uva e, conseqüentemente, sem a fortificação dessa matriz.

Para isto, pesou-se $10 \pm 0,1$ g de sulfato de sódio anidro, dentro de tubo de teflon de 250 mL de capacidade, e adicionou-se através de dispensador 30 mL de cada solvente, acetona, éter de petróleo e diclorometano, sendo em seguida, levado ao homogeneizador ultraturrax por cerca de 30 s, a 10.000 rpm. Finalmente, levou-se o tubo para centrifugação a 3600 rpm, durante 3 min e posteriormente, transferiu-se o conteúdo para erlenmeyer de vidro, com tampa esmerilhada. Este extrato foi chamado de “branco” do solvente.

3.9 Validação do método de extração mini-Luke modificado para análise de resíduos de pesticidas em uva

3.9.1 Determinação da linearidade das curvas analíticas

Avaliou-se a linearidade das curvas analíticas a partir das soluções analíticas preparadas no item 3.7.2, tanto em solvente, quanto no extrato uva, nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 mg L⁻¹. A seqüência de injeção consistiu primeiramente na introdução de acetato de etila e em seguida injetou-se 6 vezes a seqüência das soluções analíticas.

Posteriormente, realizaram-se os cálculos da média das áreas, do RSD (%), da equação da curva analítica bem como do coeficiente de determinação (r^2), e da faixa de linearidade, para cada composto analisado por GC×GC- μ ECD.

3.9.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Neste trabalho, injetaram-se soluções padrão de pesticidas no extrato da matriz na concentração de 0,01 e 0,02 mg L⁻¹ e mediu-se a altura do ruído próximo ao tempo de retenção dos compostos e em seguida determinou-se a concentração que correspondeu a 3 e 10 vezes essa altura, sendo que estas correspondem ao LOD e LOQ respectivamente.

3.9.3 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

Neste trabalho, o estudo da precisão do instrumento foi realizado efetuando-se seis injeções de cada concentração das soluções analíticas no sistema GC×GC-μECD.

A precisão do método, em termos de repetitividade (RSD_r) foi efetuada procedendo-se a extração e análise das amostras fortificadas. Cada nível de fortificação foi extraído seis vezes e cada extrato injetado uma vez.

Para avaliar a precisão intermediária (RSD_{pi}), calculado conforme descrito no item 2.4.3, do método por GC×GC-μECD, utilizaram-se 2 dias e 2 operadores diferentes para a análise.

3.9.4 Ensaios de fortificação e extração empregando o método mini-Luke modificado para avaliação da recuperação

Os ensaios de fortificação e de recuperação têm por objetivo a avaliação da exatidão do método como um todo, uma vez que se calcula a concentração real medida, no final de todo o procedimento, em comparação com a concentração conhecida adicionada inicialmente na matriz. Assim, através das recuperações obtidas dos pesticidas, pode-se avaliar a exatidão do método, e através dos RSDs calculados, obtêm-se informações acerca da repetitividade (precisão) dos dados obtidos.

Este procedimento de fortificação foi realizado 6 vezes ($n = 6$), para cada nível de fortificação (3 níveis), e também para a uva (cultivar Itália) “branco”, que é aquela sem a adição dos pesticidas, para verificação da real ausência desses compostos na matriz. Este extrato da matriz é chamado de “branco” da matriz e também foi utilizado para o preparo das soluções analíticas, quando em extrato da matriz. A amostra “branco” foi considerada como tal após análise por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS, do inglês *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) realizada pelo VWA, o qual forneceu um laudo atestando a ausência de pesticidas na amostra analisada.

A amostra “branco” de uva (cultivar Itália) foi fornecida pelo VWA, a qual foi previamente homogeneizada e armazenada em tubos de polipropileno em *freezer*. Pesaram-se porções de $10,0 \pm 0,1$ g de uva, diretamente dentro dos tubos de teflon. Efetuou-se a fortificação, utilizando-se seringas Hamilton® de injeção, para obter-se maior exatidão. Para se fortificar aos níveis de 0,02, 0,05 e 0,5 mg kg⁻¹, adicionou-se, respectivamente, 20, 50 e 500 µL, de uma solução analítica na concentração de 10 mg L⁻¹, contendo os pesticidas a serem analisados por GC×GC-µECD.

Imediatamente após a fortificação, adicionou-se 30 mL de acetona e em seguida as amostras foram levadas para extração em homogeneizador ultraturrax por 30 s a 3600 rpm. Logo após adicionou-se $10,0 \pm 0,1$ g de sulfato de sódio anidro e 30 mL dos solventes éter de petróleo e diclorometano e levou-se novamente o extrato a homogeneizador ultraturrax por tempo e rotação iguais aos descritos no item 3.8, bem como o procedimento de centrifugação e transferência do líquido para erlenmeyer. A Figura 9 mostra alguns materiais utilizados durante o procedimento de extração.

Um volume de 9 mL dos extratos obtidos foi transferido para tubos de ensaio graduados de 10 mL, e colocados em banho de água já aquecida a 45 °C, sendo que em seguida esta temperatura foi aumentada até atingir 62 °C. Os tubos foram retirados do banho alguns minutos antes de completa secura, e deixados em temperatura ambiente até obter-se secura total. Para a análise por GC×GC-µECD o extrato foi reconstituído a 1 mL com acetato de etila. O fluxograma da Figura 10 mostra as etapas efetuadas durante procedimento de extração.



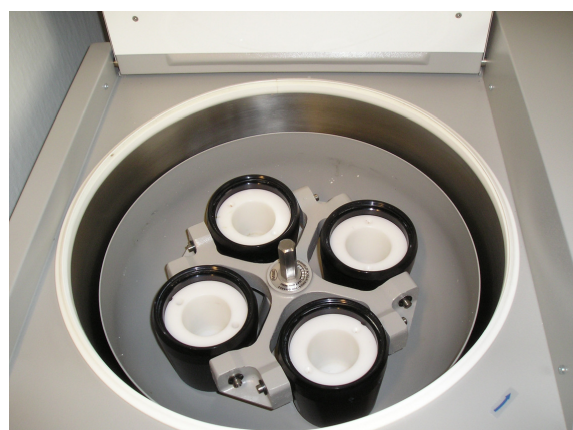
A)



B)



C)



D)

Figura 9. Materiais utilizados para a execução do método de extração mini-Luke modificado A) homogeneizador ultraturrax, B) frascos dos solventes utilizados com dispensadores, C) banho termostatizado de água e D) interior da centrífuga

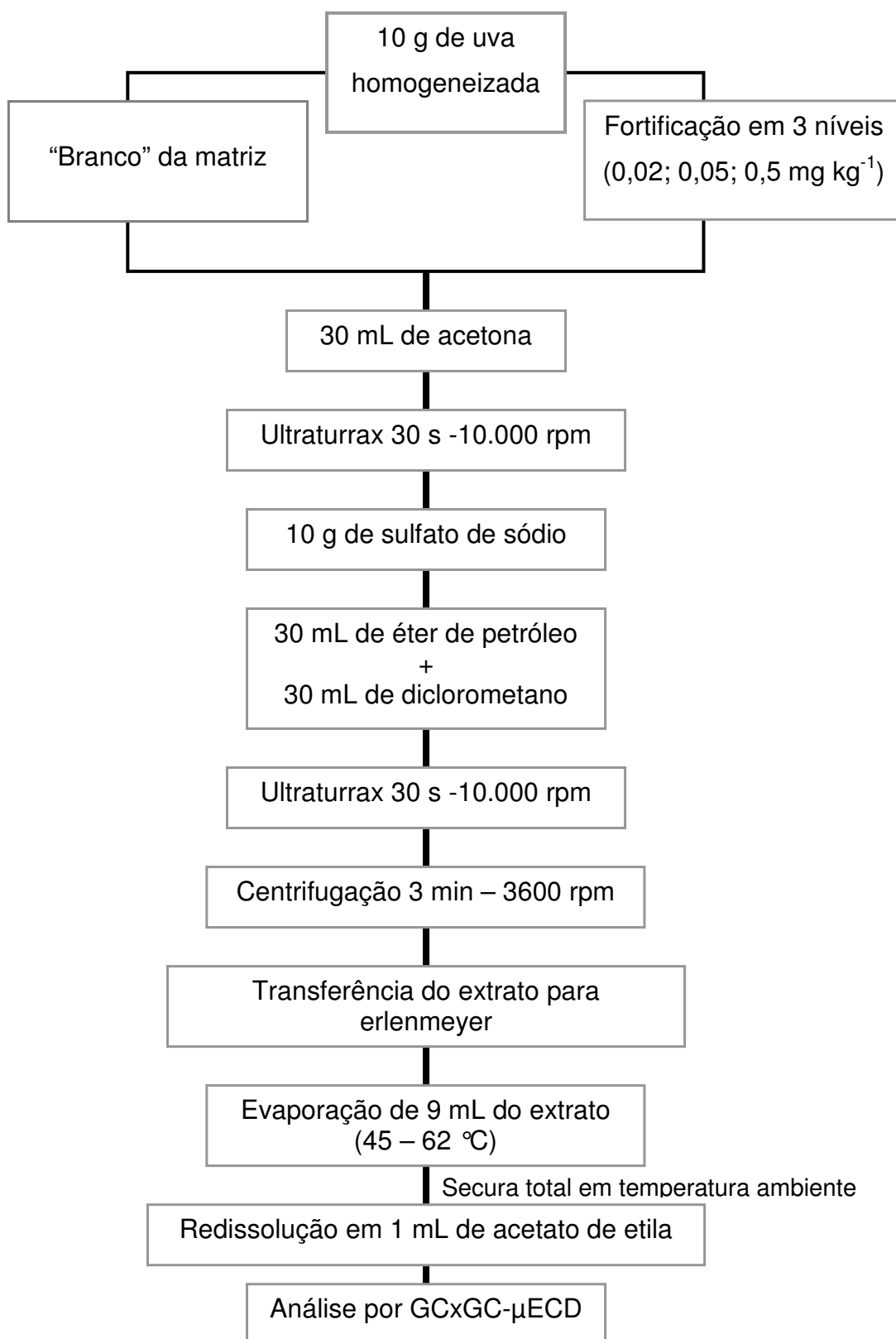


Figura 10. Representação esquemática do método de análise de resíduos de pesticidas em uva, utilizando o método de extração mini-Luke modificado

3.9.5 Avaliação do efeito matriz dos extratos de uva analisados por GC×GC- μ ECD

Para avaliar o efeito matriz neste trabalho, foram injetadas soluções (5 concentrações diferentes x 6 vezes cada) preparadas tanto no solvente quanto no extrato da matriz e as áreas obtidas foram comparadas. Efetuou-se o cálculo conforme descrito no item 2.4.5. Desta forma pode-se verificar se o efeito matriz exerceu influência nas análises realizadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este capítulo foi dividido em 2 partes, sendo que a primeira compreendeu o desenvolvimento e avaliação do modulador, e posteriormente foi abordada a aplicação deste na validação de método analítico.

4.1 Desenvolvimento de um novo modulador fixo a ar e avaliação do processo de modulação utilizando alcanos e pesticidas e análise por GC×GC-FID

4.1.1 *Design* de um novo modulador usando ar comprimido para GC×GC-FID

O modulador de duplo jato de ar comprimido possui praticamente o mesmo design do modulador de duplo jato de CO₂. No modulador a ar comprimido, bem como o modulador de duplo jato de CO₂, duas porções da coluna capilar são resfriadas diretamente e alternadamente nos primeiros centímetros da segunda coluna com o objetivo de acumular e focalizar cada fração subsequente do analito, o qual é em seguida exposto à temperatura do forno cromatógrafo e imediatamente re-volatilizado.

Os jatos de ar comprimido são conduzidos por meio de duas válvulas elétricas que alternadamente abrem e fecham a linha de ar comprimido. O modulador original de ar comprimido (JOVER *et al.*, 2005) (Figura 11A) possui duas tubulações para a passagem do ar até a coluna. Este modulador apresentou o mesmo problema do modulador com duplo jato de CO₂ com relação ao ajuste dos jatos, com o objetivo de resfriar a coluna. Após algumas injeções, o modulador com duplo jato de ar comprimido original apresentou um pequeno deslocamento nas tubulações, o que conseqüentemente levou a modulações imperfeitas, baixa repetitividade das áreas dos picos cromatográficos e dos tempos de retenção. Outro problema observado foi o ruído sonoro produzido pelo ar nas tubulações.

A fim de melhorar o desempenho do modulador de ar comprimido original (Figura 11A) e, tornar a instalação mais fácil, estável e robusta desenvolveu-se

um novo modelo de modulador (Figura 11B). Para isto, um bloco de alumínio foi cortado e fixado nas duas tubulações (Figura 12) por onde o ar é conduzido até a coluna, sendo esta fixada na peça de alumínio. Desta forma, problemas encontrados no modulador original foram solucionados.

O modulador com ar comprimido desenvolvido foi facilmente instalado depois de se fazer dois pequenos furos através do topo do forno do cromatógrafo. A peça de alumínio juntamente com as tubulações são as únicas partes do modulador que estão dentro do forno. A distância entre a coluna e o modulador é constante, devido à fixação da coluna no modulador; sendo assim a coluna capilar está sempre no mesmo lugar, o que tornou este modulador mais estável e robusto comparado ao modelo original do modulador a ar comprimido (Figura 11A).

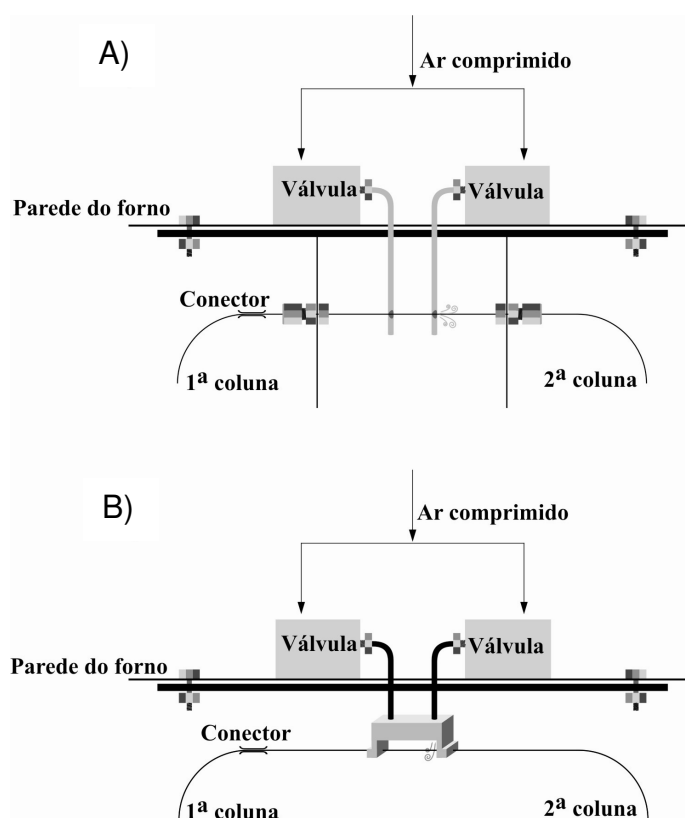


Figura 11. Esquema do modulador a ar comprimido para GCxGC: A) modulador com duplo jato de ar comprimido original e B) modulador com duplo jato de ar comprimido modificado



Figura 12. Representação do modulador com duplo jato de ar comprimido modificado

No modulador com ar comprimido as colunas capilares podem ser facilmente trocadas, pois somente um conector de vidro (*press fit*) é utilizado para fazer a junção entre a primeira e a segunda coluna. Entretanto, a desvantagem deste modulador comparado ao modulador de duplo jato de CO₂ é a faixa de trabalho, pois o ar comprimido tem uma capacidade limitada de resfriamento sobre a coluna.

No modulador com duplo jato de CO₂ são utilizados dois conectores de metal para manter a segunda coluna no mesmo lugar. Os conectores são apertados em um suporte, o qual pode ser pressionado e empurrado junto com a coluna. A conexão coluna-conector deve ser verificada diariamente e um ajuste semanal pode vir a ser necessário. Esta verificação é importante, pois os conectores que prendem a coluna podem ceder devido às altas variações da temperatura e possíveis vibrações na coluna. Para o modulador com ar comprimido este ajuste não se faz necessário. Na Figura 13 podem ser visualizadas algumas fotos do sistema GC×GC utilizado neste trabalho bem como o modulador desenvolvido.

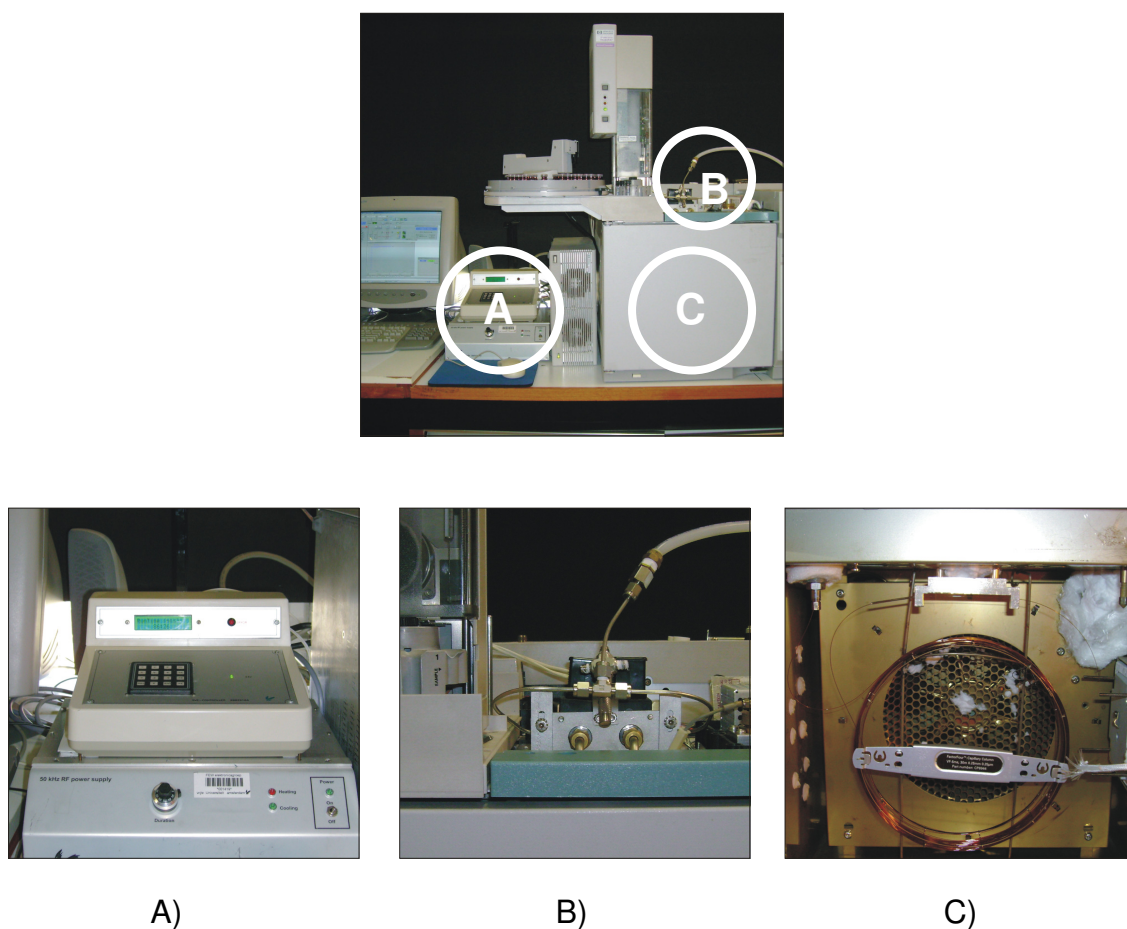


Figura 13. Sistema GCxGC utilizado: A) controle do modulador, B) modulador (visualização da parte superior do forno) e C) modulador (visualização da parte interior do forno)

4.1.2 Desempenho da modulação

Na Figura 14 estão representadas três frações de cromatogramas que apresentam modulações A) insatisfatória, B) aceitável e C) perfeita. O modulador com CO_2 possui uma faixa de trabalho mais ampla em comparação ao modulador a ar, pois quando o CO_2 é utilizado, o primeiro alceno que apresenta modulação perfeita é o C_6 , diferentemente do modulador com ar, no qual modulações satisfatórias foram obtidas somente a partir do C_{17} (Figura 15).

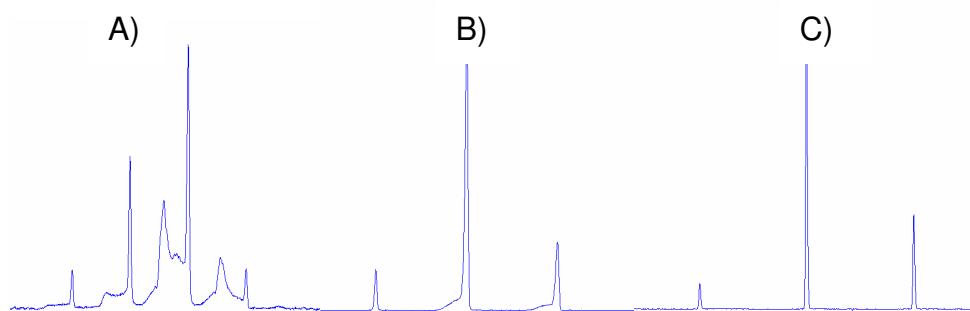


Figura 14. Três frações de cromatogramas lineares obtidos por GC×GC-FID utilizando o modulador a ar comprimido a partir de soluções padrões de alcanos: A) modulação insatisfatória, B) modulação aceitável e C) modulação perfeita

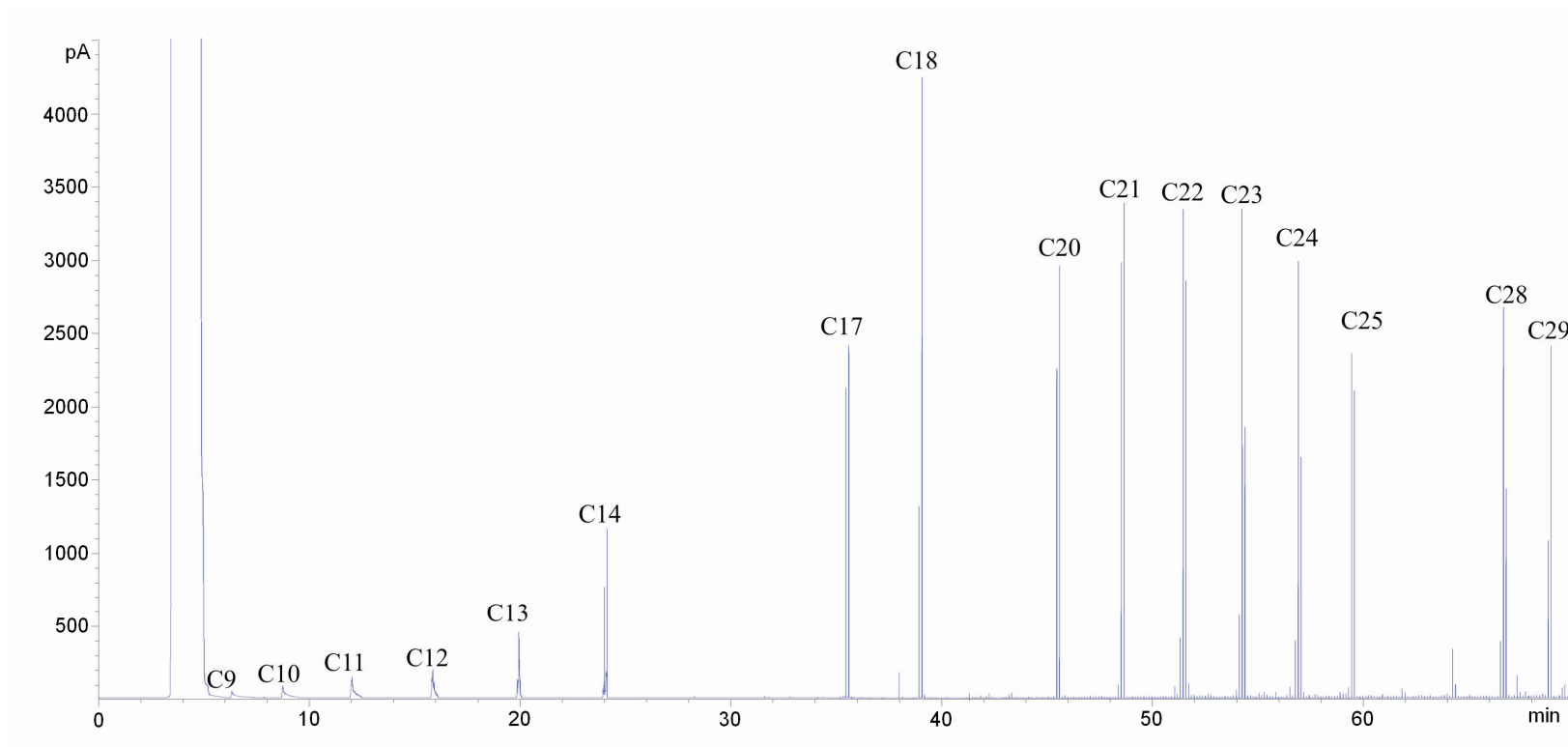


Figura 15. Cromatograma linear obtido por GCxGC-FID a partir de uma solução contendo 18 alcanos. As condições cromatográficas estão descritas no item 3.1

Com o objetivo de avaliar o desempenho do modulador proposto, injetou-se uma mistura contendo 18 alcanos em um GC×GC-FID. A Tabela 5 fornece uma noção geral da faixa de aplicação, relatando as variações das áreas dos picos e as variações dos tempos de retenção tanto na primeira quanto na segunda coluna.

Para avaliar a repetitividade e a precisão intermediária do modulador com ar comprimido injetou-se (6 concentrações diferentes em triplicata, em dias diferentes) uma mistura contendo 18 alcanos e 9 pesticidas. Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram pequenas variações das áreas dos picos, entre 0,67 a 2,80% para alcanos e 0,24 e 5,34% para pesticidas. Estes resultados mostram que o sistema é estável.

O desvio padrão (SD, do inglês *standard deviation*) dos tempos de retenção na primeira coluna para alcanos e pesticidas foi em torno de 0,05 min. Para os tempos de retenção na segunda coluna, o SD foi de 0,04 s para a maioria dos compostos, exceto para ciflutrina e permetrina (0,08 s). A correta identificação é dada pelos dois tempos de retenção, os quais devem apresentar poucas variações.

Tabela 5. Parâmetros usados para avaliar o desempenho do modulador com ar comprimido para alcanos e pesticidas

Compostos	nº de carbonos	Ponto de ebulição (°C)	Repetitividade				Precisão Intermediária					
			Area do pico RSD (%)	¹ t _R (min)	SD (min)	² t _R (s)	SD (s)	Area do pico RSD (%)	¹ t _R (min)	SD (min)	² t _R (s)	SD (s)
Heptadecano	17	302	0,93	28,5	0,05	0,8	0,04	2,77	28,5	0,05	0,8	0,04
Octadecano	18	316	1,31	31,9	0,00	0,8	0,00	2,49	31,9	0,00	0,8	0,00
Icosano	20	343	1,46	38,3	0,05	0,9	0,00	2,45	38,3	0,05	0,9	0,00
Henicosano	21	357	1,54	41,4	0,04	0,9	0,04	2,51	41,4	0,04	0,9	0,04
Docosano	22	369	1,66	44,3	0,05	0,9	0,04	2,50	44,3	0,05	0,9	0,04
Tricosano	23	380	1,69	47,0	0,06	0,9	0,05	2,33	47,0	0,06	0,9	0,05
Tetracosano	24	391	0,67	49,8	0,07	1,0	0,04	2,43	49,8	0,07	1,0	0,04
Pentacosano	25	402	1,96	52,3	0,00	1,0	0,00	1,64	52,3	0,00	1,0	0,00
Octacosano	28	432	2,55	59,4	0,05	1,1	0,04	2,74	59,4	0,05	1,1	0,04
Nonacosano	29	441	1,68	31,7	0,00	1,1	0,04	2,80	31,7	0,00	1,1	0,04
Trifluralina	13	96	0,76	27,5	0,04	1,1	0,04	3,54	27,5	0,04	1,1	0,04
Fenitrotiona	9	140	2,08	37,0	0,06	2,1	0,04	3,15	37,0	0,06	2,1	0,04
Fipronil	12	202	2,76	40,2	0,05	1,3	0,04	2,98	40,2	0,05	1,3	0,04
Trifloxistrobina	20	312	1,35	48,4	0,08	2,2	0,04	3,66	48,4	0,08	2,2	0,04
Bifentrina	23	150	1,93	51,9	0,05	1,8	0,04	5,34	51,9	0,05	1,8	0,04
Permetrina	21	200	0,24	55,9	0,05	2,1	0,08	3,33	55,9	0,05	2,1	0,08
Ciflutrina	22	138	0,24	58,0	0,06	2,3	0,08	4,71	58,0	0,06	2,3	0,08
Cipermetrina	22	220	1,42	60,6	0,05	2,3	0,05	2,09	60,6	0,05	2,3	0,05
Esfenvalerato	25	151	0,51	63,2	0,04	2,5	0,05	2,92	63,2	0,04	2,5	0,05

¹t_R – tempo de retenção na primeira dimensão, ²t_R – tempo de retenção na segunda dimensão e SD – desvio padrão

4.1.3 Análise de pesticidas por GC×GC-FID utilizando o modulador com ar

Dados de repetitividade (Tabela 5) e linearidade (Tabela 6) das medidas das áreas dos picos foram considerados satisfatórios, bem como a repetitividade dos tempos de retenção na segunda dimensão para a aplicação pretendida. Usando o sistema GC×GC-FID foi obtida uma faixa linear de 0,1 a 5,0 mg L⁻¹ com um coeficiente de determinação maior do que 0,9945 para os pesticidas analisados (Tabela 6). Os resultados mostram que é possível analisar alguns pesticidas, usando um sistema GC×GC-FID com um modulador a ar comprimido para avaliação do processo de modulação.

Tabela 6. Equação da reta, coeficiente de determinação (r^2) e faixa linear para os pesticidas selecionados e analisados por GC×GC-FID

Nº	Pesticida	Faixa linear (mg L ⁻¹)	Equação da reta	r^2
1	Trifluralina	0,1-5,0	$y = 2,259x + 0,10$	0,9954
2	Fenitrotiona	0,25-5,0	$y = 1,190x - 0,23$	0,9993
3	Fipronil	0,25-5,0	$y = 0,942x - 0,04$	0,9985
4	Trifloxistrobina	0,1-5,0	$y = 2,640x + 0,06$	0,9954
5	Bifentrina	0,1-5,0	$y = 3,503x + 0,23$	0,9945
6	Permetrina	0,1-5,0	$y = 6,011x - 0,08$	0,9984
7	Ciflutrina	0,25-5,0	$y = 0,322x - 0,01$	0,9985
8	Cipermetrina	0,25-5,0	$y = 1,011x + 0,03$	0,9957
9	Esfenvalerato	0,25-5,0	$y = 1,332x - 0,14$	0,9999

Plotando os dados dos tempos de retenção na primeira e na segunda coluna obtêm-se um diagrama de ápices (Figura 16A) e um diagrama de cores em 2D (Figura 16B), sendo possível identificar a posição de cada composto em soluções padrão de alcanos e pesticidas.

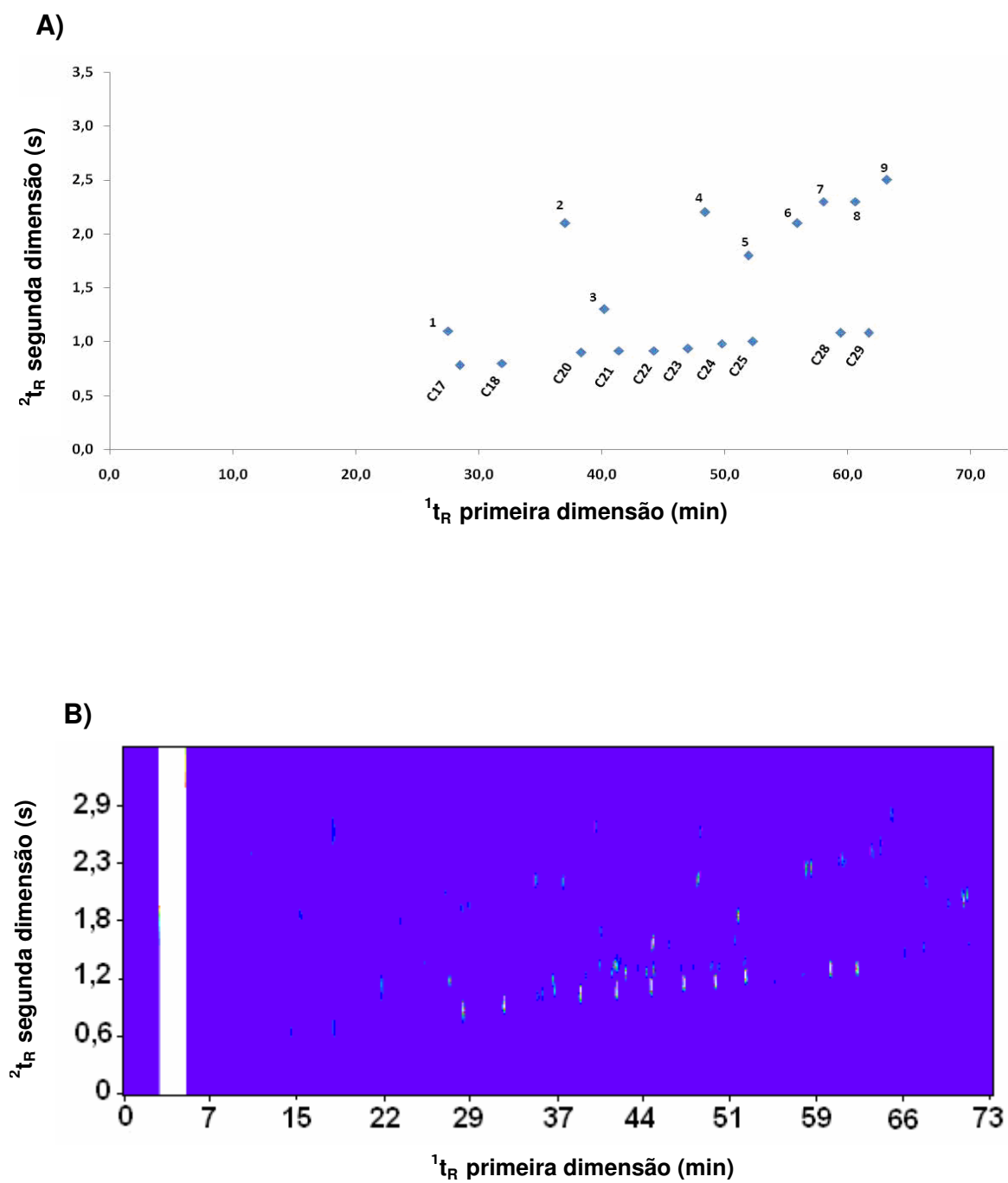


Figura 16. Visualização dos diagramas: A) de ápices e B) de cores obtidos por GC \times GC-FID a partir de uma solução padrão da mistura de alcanos e pesticidas (Tabela 5) preparada em solvente orgânico (metanol)

4.2 Aplicação do modulador a ar comprimido na avaliação do método mini-Luke modificado para extração de pesticidas fortificados em uva e análise por GC×GC-μECD

Os tempos de retenção de cada pesticida analisado por GC×GC-μECD na primeira e na segunda coluna, 1t_R e 2t_R , respectivamente estão listados na Tabela 7.

Tabela 7: Pesticidas analisados por GC×GC-μECD, tempos de retenção na primeira e na segunda coluna

Nº	Pesticida	Tempo de retenção na primeira coluna (1t_R) min	Tempo de retenção na segunda coluna (2t_R) s
1	Bifentrina	16,10	1,1
2	Permetrina cis	19,36	1,3
3	Permetrina trans	19,60	1,3
4	Cipermetrina I	20,94	1,3
5	Cipermetrina II	21,10	1,3
6	Cipermetrina III	21,18	1,3
7	Cipermetrina IV	21,27	1,3
8	Fenvalerato	22,61	1,4
9	Esfenvalerato	23,03	1,4
10	Deltametrina	24,03	1,5

4.2.1 Análise dos solventes e reagentes pelo método de extração mini-Luke modificado

Ao efetuar-se o procedimento de extração descrito no item 3.8, não se observou nenhuma contaminação dos solventes e reagentes utilizados para a extração dos pesticidas da uva pelo método mini-Luke modificado (Figura 17).

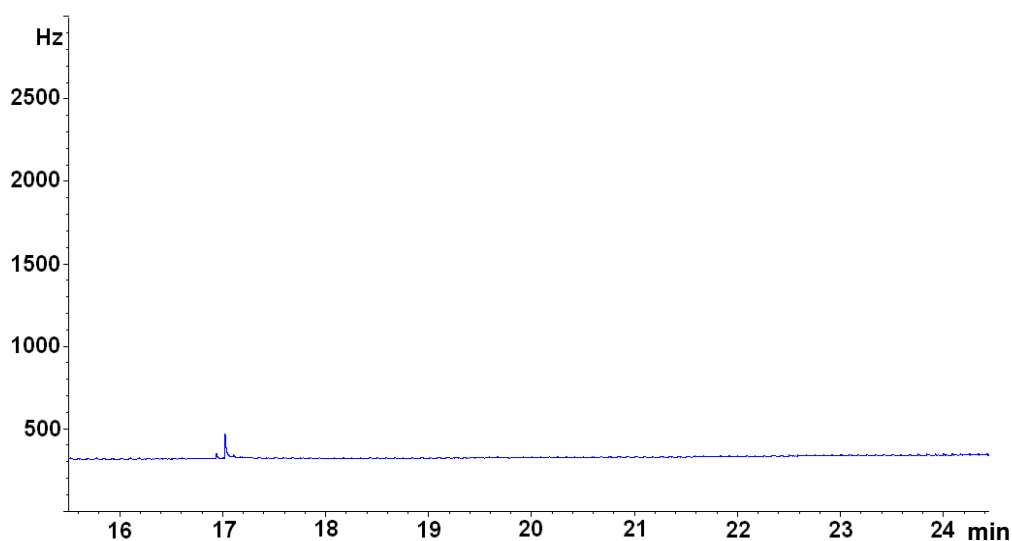


Figura 17. Cromatograma do “branco” dos solventes e reagentes obtido por GC×GC-μECD nas condições descritas no item 3.2

4.2.2 Validação do método de extração mini-Luke modificado para análise de resíduos de pesticidas em uva

Todas as soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em solvente (acetato de etila) e no extrato da uva (método de mini-Luke modificado), assim foi possível avaliar o efeito da presença do extrato da matriz na determinação de valores de LOD e LOQ (instrumento e método), da linearidade das curvas analíticas (faixa linear, equação da curva e coeficiente de determinação), uma vez que o efeito matriz pode influenciar nos resultados, dependendo dos compostos e da técnica cromatográfica empregada. Tanto

fenvalerato (soma dos isômeros esfenvalerato e fenvalerato) quanto permetrina (soma dos isômeros cis e trans) foram quantificados somando-se as áreas dos isômeros, de acordo com a legislação da União Européia, a qual estabelece MRL para a soma dos isômeros destes pesticidas.

4.2.2.1 Linearidade das curvas analíticas

As Tabelas 8 e 9 apresentam as equações das curvas analíticas para os pesticidas analisados em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz (uva), respectivamente.

Tabela 8. Resultados obtidos para as curvas analíticas dos pesticidas em acetato de etila

Pesticida	Equação da reta ($y=ax+b$)	r^2	Intervalo linear (mg L^{-1})
Bifentrina	$y = 8826,2x + 55,682$	0,9979	0,01-0,5
Cipermetrina	$y = 14918x - 30,987$	0,9994	0,02-0,5
Deltametrina	$y = 15848x - 7,8592$	0,9989	0,01-0,5
Fenvalerato ^a	$y = 32024x - 2,5751$	0,9991	0,01-0,5
Permetrina ^b	$y = 6032,5x + 55,067$	0,9956	0,02-0,5

a = soma dos isômeros esfenvalerato e fenvalerato; b = soma dos isômeros cis e trans

Tabela 9. Resultados obtidos para as curvas analíticas dos pesticidas no extrato da matriz

Pesticida	Equação da reta ($y=ax+b$)	r^2	Intervalo linear (mg L^{-1})
Bifentrina	$y = 8013x + 9,9278$	1,0000	0,01-0,5
Cipermetrina	$y = 13752x - 119,08$	0,9994	0,02-0,5
Deltametrina	$y = 16355x - 93,763$	0,9999	0,01-0,5
Fenvalerato ^a	$y = 30910x - 113,87$	0,9999	0,01-0,5
Permetrina ^b	$y = 5620,7x - 1,5159$	0,9999	0,02-0,5

a = soma dos isômeros esfenvalerato e fenvalerato; b = soma dos isômeros cis e trans

A partir desses resultados pode-se concluir que a faixa linear obtida por GC×GC- μ ECD foi de 2 ordens de grandeza, sendo que o primeiro ponto da curva corresponde ao limite de quantificação do método.

Pelos coeficientes angulares (a) das equações das retas pode-se perceber que o método apresenta maior sensibilidade para o fenvalerato (soma dos isômeros fenvalerato e esfenvalerato) dentre os pesticidas analisados por GC×GC- μ ECD.

Analisando-se as equações das retas obtidas pode-se concluir que o modelo linear é bastante adequado já que os coeficientes de determinação (r^2) foram todos maiores que 0,9956 para as curvas analíticas preparadas em solvente (acetato de etila) e maiores que 0,9999 para as curvas preparadas no extrato da matriz (uva), o que segundo a literatura é satisfatório (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

4.2.2.2 Limite de detecção e limite de quantificação

A Tabela 10 apresenta os valores de LOD e LOQ para o instrumento e método. Os limites de detecção e quantificação, os quais foram obtidos conforme descrito no item 3.9.2, foram semelhantes para todos os pesticidas analisados.

Os valores apresentados na Tabela 10 são considerados satisfatórios, pois permitem determinar concentrações abaixo dos limites máximos de resíduos permitidos na Anvisa, *Codex Alimentarius* e União Européia (Tabela 2).

Tabela 10. Valores de LOD e LOQ para os pesticidas

Pesticida	Limites do instrumento (mg L ⁻¹)		Limites do método (mg kg ⁻¹)	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Bifentrina	0,003	0,01	0,003	0,01
Cipermetrina	0,006	0,02	0,006	0,02
Deltametrina	0,003	0,01	0,003	0,01
Fenvalerato ^a	0,003	0,01	0,003	0,01
Permetrina ^b	0,006	0,02	0,006	0,02

a = soma dos isômeros esfenvalerato e fenvalerato; b = soma dos isômeros cis e trans

4.2.2.3 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

Os resultados de precisão para o método estão demonstrados juntamente com os resultados de recuperação, na Tabela 11. A precisão intermediária para os pesticidas foi realizada empregando-se dias e operadores diferentes daqueles dos estudos de repetitividade. Os valores para a repetitividade dos pesticidas ficaram entre 5,9 e 17,2% e para a precisão intermediária ficaram entre 2,6 e 18,4%.

Para validação de métodos cromatográficos, na faixa de concentração avaliada nesse trabalho, recomenda-se que a precisão deve apresentar $RSD \leq 20\%$ (RIBANI *et al.*, 2004). Portanto, todos os resultados obtidos estão dentro dos limites sugeridos.

4.2.2.4 Ensaios de fortificação e extração empregando o método mini-Luke modificado para avaliação da recuperação

A Tabela 11 apresenta os valores de recuperação obtidos para as fortificações, em diferentes níveis de concentração, para os pesticidas, utilizando-se o procedimento descrito no item 3.9.4. As recuperações para os pesticidas ficaram entre 94,3 e 115,2%, com precisão menor que 18,4%.

Tabela 11. Recuperação, RSD_r e RSD_{pi} do método para os pesticidas

Pesticida	Nível de fortificação (mg kg ⁻¹)	Repetitividade		Precisão intermediária	
		Recuperação (%)	RSD_r (%)	Recuperação (%)	RSD_{pi} (%)
Bifentrina	0,02	101,9	5,9	99,9	6,6
	0,05	97,6	13,2	98,4	2,6
	0,5	96,6	6,7	100,7	3,6
Cipermetrina	0,02	113,3	11,2	115,2	7,9
	0,05	97,5	17,2	98,2	6,1
	0,5	98,2	9,4	95,6	4,8
Deltametrina	0,02	105,2	12,3	112,5	18,4
	0,05	97,1	15,2	95,1	14,5
	0,5	97,1	10,9	103,4	6,5
Fenvalerato ^a	0,02	107,7	7,3	110,9	10,2
	0,05	99,7	12,2	94,3	9,1
	0,5	98,4	9,8	102,7	6,5
Permetrina ^b	0,02	106,6	8,7	113,7	6,7
	0,05	95,3	15,2	107,5	3,8
	0,5	99,0	9,0	97,3	5,0

a = soma dos isômeros esfenvalerato e fenvalerato; b = soma dos isômeros cis e trans

n = 6 (6 extrações × 1 injeção de cada extrato)

A recuperação depende da amostra, do procedimento de extração e da concentração do analito. Neste trabalho, seguiu-se a recomendação de que, para validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos, as recuperações devem estar entre 70 e 120% (RIBANI *et al.*, 2004). Todos os valores obtidos apresentaram-se dentro desse intervalo e, portanto, o método está de acordo com os parâmetros exigidos.

A Figura 18 apresenta o cromatograma obtido por GC×GC-μECD do extrato da matriz “branco” preparado conforme o item 3.9.4. A Figura 19 apresenta os cromatogramas dos pesticidas piretróides obtidos por GC×GC-μECD a partir de soluções analíticas preparadas em A) solvente orgânico (acetato de etila) e B) no extrato da uva na concentração de 0,05 mg L⁻¹. A Figura 19C apresenta o cromatograma de um extrato da uva “branco” fortificado com os pesticidas piretróides ao nível de 0,05 mg kg⁻¹. As Figuras 20A, 20B e 20C correspondem à visualização dos cromatogramas da Figura 19A, 19B e 19C respectivamente em diagramas de cores.

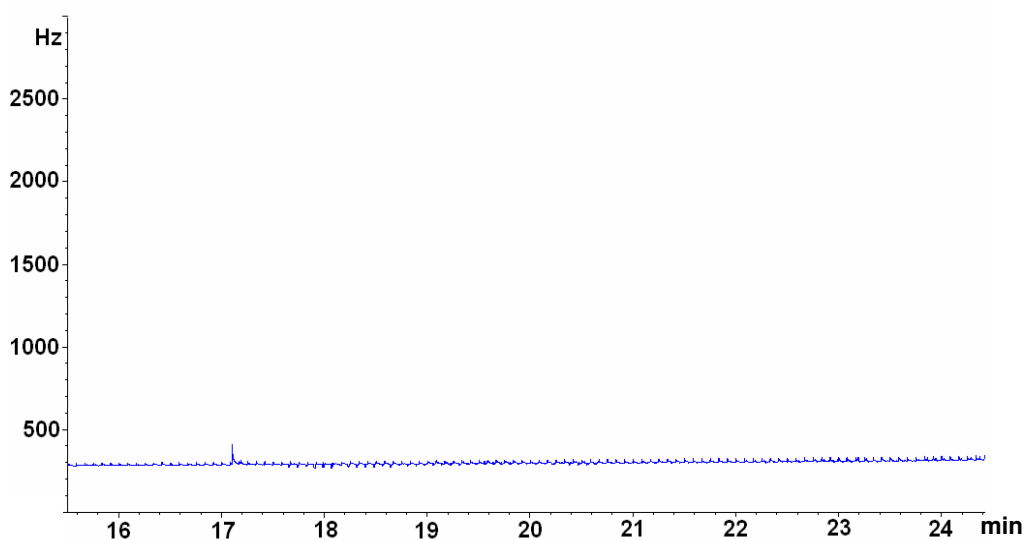


Figura 18. Cromatograma obtido por GC×GC-μECD para o extrato “branco” da uva

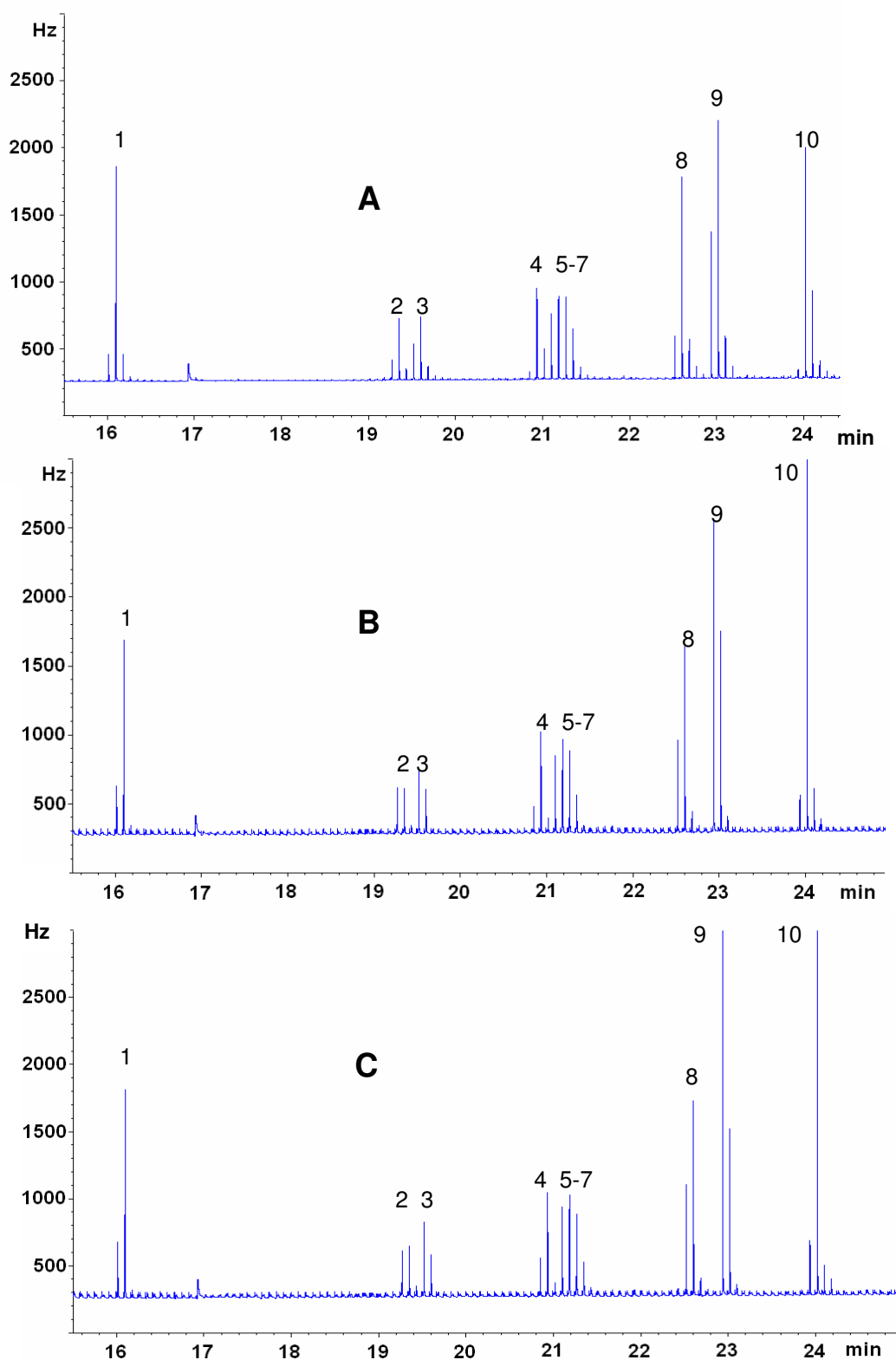


Figura 19. Cromatograma linear de uma solução analítica na concentração de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ dos pesticidas analisados por GCxGC- μ ECD preparados em A) solvente orgânico (acetato de etila), B) no extrato da uva; e C) extrato “branco da matriz” fortificado com os pesticidas piretróides ao nível de $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ (identificação de acordo com a Tabela 7)

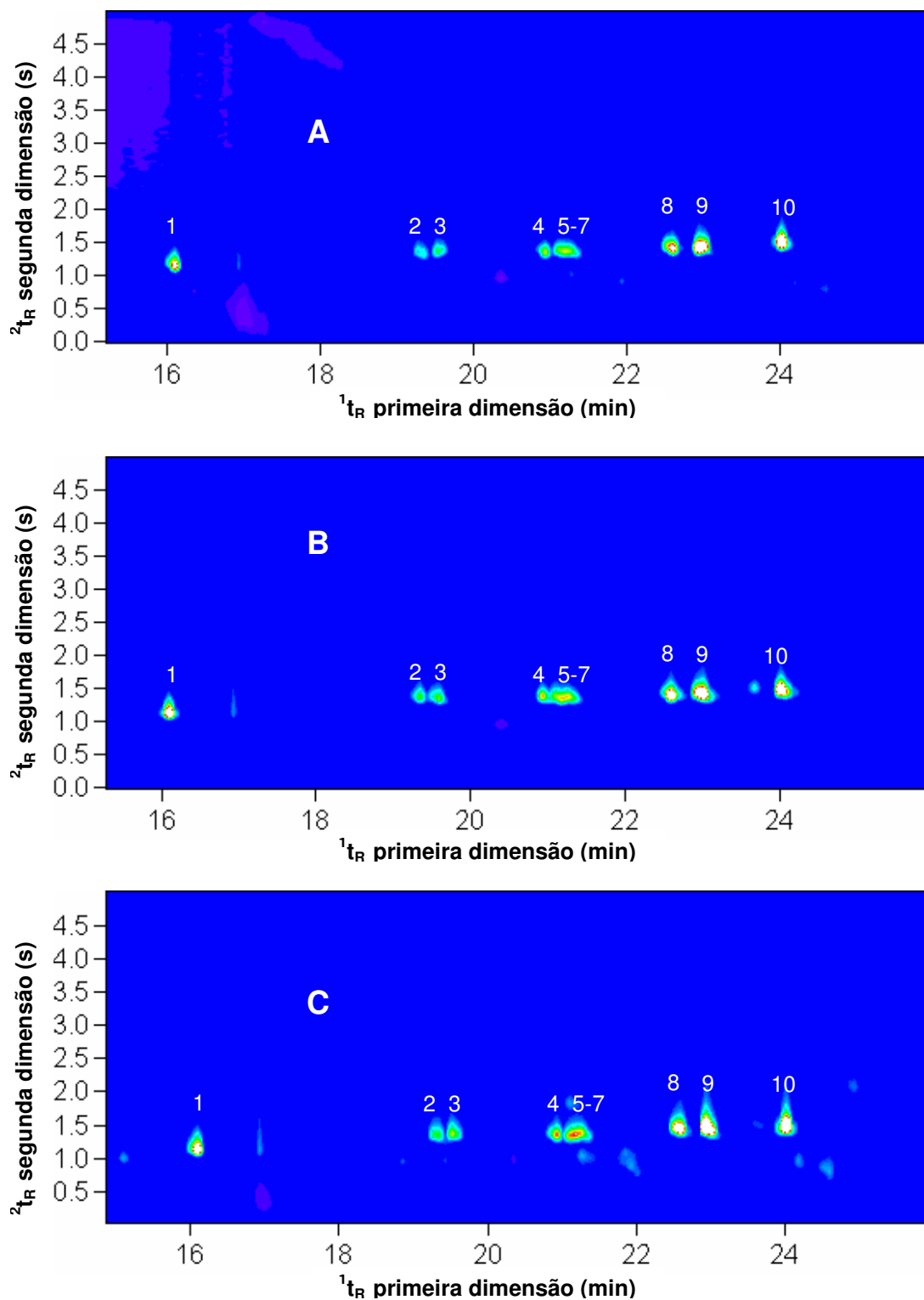


Figura 20. Diagrama de cores de uma solução analítica na concentração de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ dos pesticidas analisados por GC \times GC- μ ECD preparados em A) solvente orgânico (acetato de etila), B) no extrato da uva; e C) extrato “branco da matriz” fortificado com os pesticidas piretróides ao nível de $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ (identificação de acordo com a Tabela 7)

4.2.2.5 Efeito matriz dos extratos de uva nas análises por GC×GC-μECD

Efeito matriz é o efeito observado pelo aumento ou decréscimo na resposta do detector, para um determinado analito, presente no extrato da matriz, comparado com a resposta do detector para o analito em solvente orgânico. Por outro lado, deve-se perceber que o efeito matriz pode facilmente tornar-se maior, em baixas concentrações do analito, pois há um decréscimo na razão da concentração do analito:concentração da matriz (HAJSLOVÁ & ZROSTLÍKOVÁ, 2003).

O efeito matriz sempre sofre variações ao longo do tempo e também varia dependendo da condição do instrumento utilizado, devendo, por isso, ser constantemente avaliado, tanto na etapa de desenvolvimento do método quanto na aplicação deste método nas análises de rotina (HAJSLOVÁ & ZROSTLÍKOVÁ, 2003).

Nas Figuras 21, 22, 23, 24, e 25 estão representadas as curvas analíticas para os pesticidas analisados tanto em solvente (acetato de etila) quanto no extrato da uva, onde se pode observar um efeito matriz negativo para todos os pesticidas determinados na uva, exceto para deltametrina.

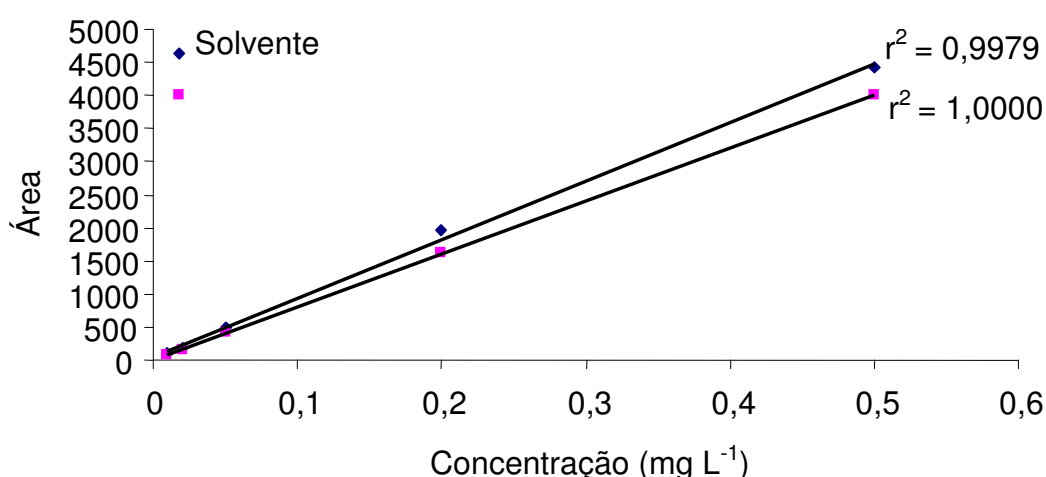


Figura 21. Curva analítica do pesticida bifentrina preparado em solvente orgânico (acetato de etila) e no extrato da matriz da uva nas condições cromatográficas descritas no item 3.2

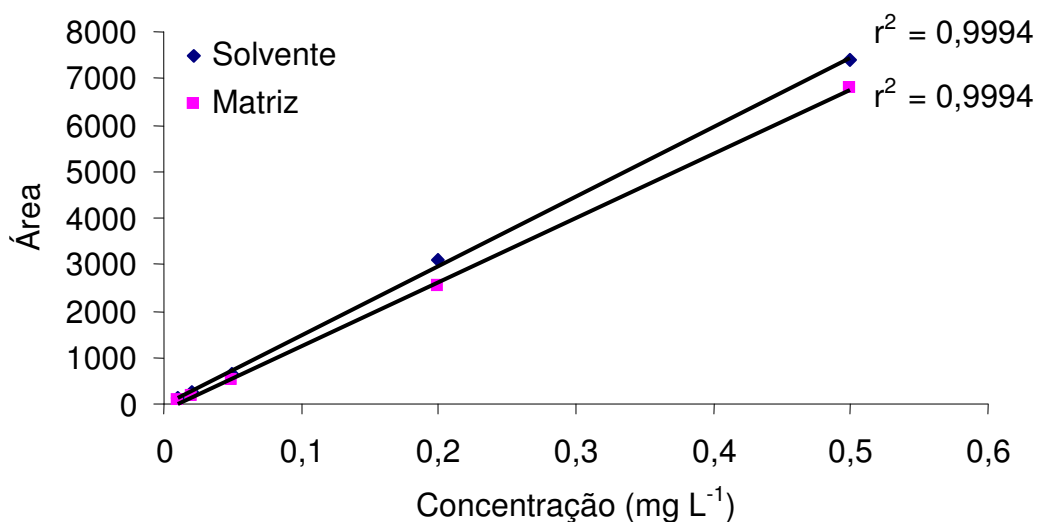


Figura 22. Curva analítica do pesticida cipermetrina preparado em solvente orgânico (acetato de etila) e no extrato da matriz da uva nas condições cromatográficas descritas no item 3.2

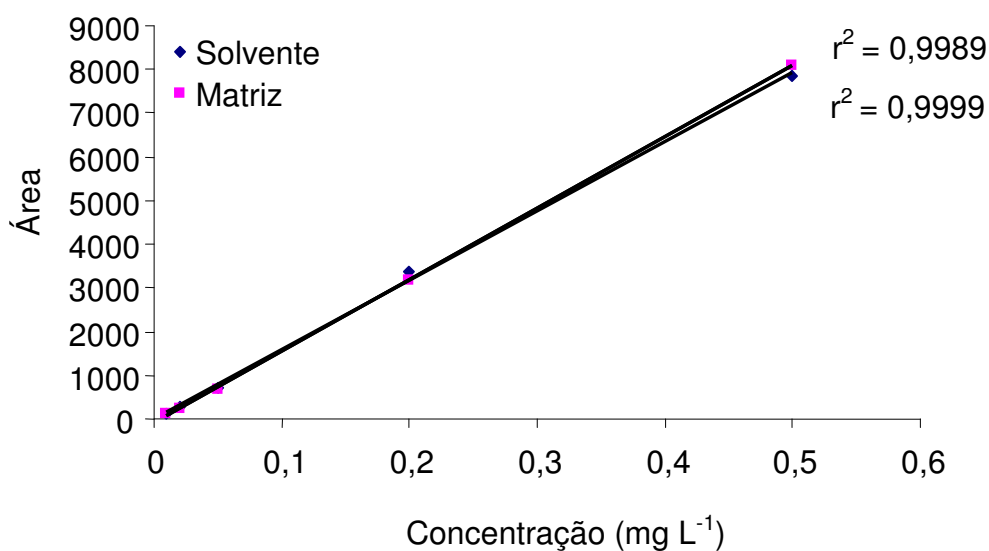


Figura 23. Curva analítica do pesticida deltametrina preparado em solvente orgânico (acetato de etila) e no extrato da matriz da uva nas condições cromatográficas descritas no item 3.2

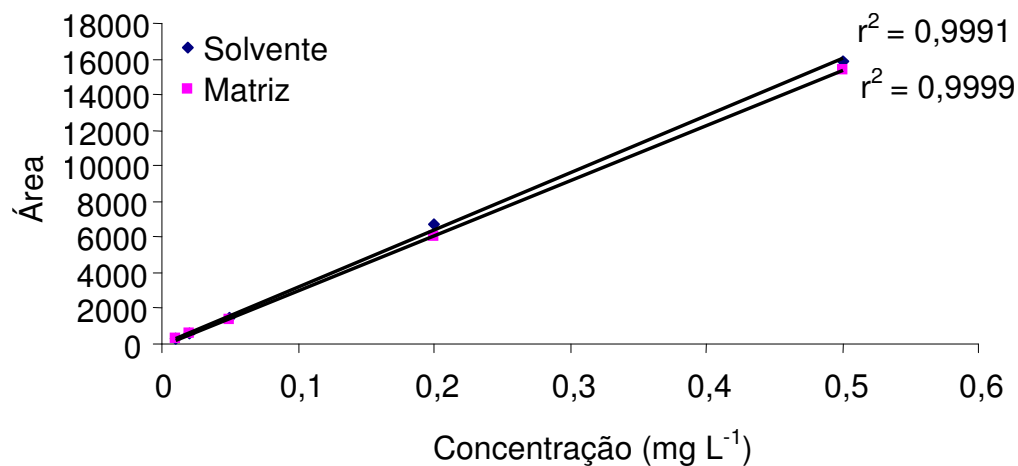


Figura 24. Curva analítica do pesticida fenvalerato preparado em solvente orgânico (acetato de etila) e no extrato da matriz da uva nas condições cromatográficas descritas no item 3.2

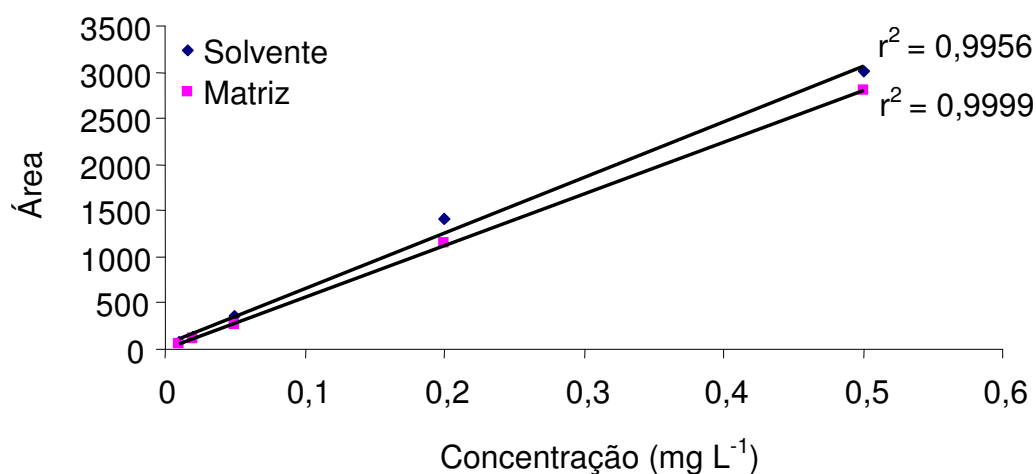


Figura 25. Curva analítica do pesticida permetrina preparado em solvente orgânico (acetato de etila) e no extrato da matriz da uva nas condições cromatográficas descritas no item 3.2

Os pesticidas bifentrina, cipermetrina, fenvalerato (soma dos isômeros esfenvalerato e fenvalerato) e permetrina (soma dos isômeros cis e trans) apresentaram considerável efeito matriz negativo, quando extraídos pelo método de extração mini-Luke modificado. A diferença entre o sinal obtido no solvente e na matriz pode ser atribuída a dois fatores: à interação dos componentes da matriz com os pesticidas analisados causando uma diminuição do sinal analítico e/ou ao aumento do ruído da linha base quando os pesticidas foram preparados no extrato da matriz resultando em uma integração menor da área do pico cromatográfico quando comparada às soluções dos pesticidas em solvente orgânico. Um efeito oposto foi observado para a deltametrina, o qual pode ser visualizado na Figura 23, onde se percebe que valores maiores de área foram obtidos quando este pesticida foi preparado no extrato da matriz. Através do cálculo do efeito matriz percentual valores menores que 10% foram obtidos, sendo assim, verificou-se que para este pesticida a matriz não exerceu influência nas análises.

De maneira geral, pode-se dizer que, para a quantificação dos resíduos de pesticidas em extratos de uva, analisados por GC×GC- μ ECD, as soluções analíticas devem ser preparadas nos extratos da matriz.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi demonstrado o desenvolvimento, avaliação e aplicação de um novo modulador fixo com duplo jato de ar comprimido, com o objetivo de reduzir o custo de análise de rotina de pesticidas, uma vez que a utilização de nitrogênio ou dióxido de carbono para modulação, aumenta significativamente o custo das análises.

Para a avaliação do modulador com ar comprimido foi utilizado um sistema GC×GC-FID, o qual possibilitou a determinação de alcanos com mais de 17 carbonos e pesticidas ao nível de concentração de 0,25 mg L⁻¹.

Os resultados mostraram pequenas variações das áreas dos picos, entre 0,67 e 2,80% para alcanos e 0,24 e 5,34% para pesticidas. O desvio padrão (SD) para os tempos de retenção na primeira coluna (¹t_R) para alcanos e pesticidas foi em torno de 0,05 min. Para os tempos de retenção na segunda coluna (²t_R), o SD foi 0,04 s para a maioria dos compostos, exceto para ciflutrina e permetrina (0,08 s).

A faixa linear situou-se entre 0,1 a 5,0 mg L⁻¹ com coeficiente de determinação (r²) maior que 0,9945 para todos os pesticidas analisados por GC×GC-FID com modulador a ar comprimido, o que mostra a possibilidade da utilização deste sistema para a determinação de pesticidas.

Os resultados obtidos na avaliação do modulador com duplo jato de ar comprimido mostraram que este modulador é simples, estável, robusto e de fácil instalação, sendo possível sua utilização em análises de rotina como, por exemplo para pesticidas. Entretanto, este modulador possui um poder de resfriamento limitado, não sendo possível a determinação de compostos com baixos pontos de ebulição.

O modulador desenvolvido foi aplicado na validação de método analítico utilizando um sistema GC×GC-μECD para determinação de pesticidas piretróides em uva, os quais foram extraídos utilizando o método de extração mini-Luke modificado.

Na validação do método obtiveram-se resultados satisfatórios. As curvas analíticas apresentaram valores de r² maiores que 0,9956 e 0,9999 para as

curvas preparadas em solvente orgânico (acetato de etila) e extrato da matriz (uva), respectivamente, com faixa linear entre 0,01 a 0,5 mg L⁻¹.

Os resultados obtidos através do cálculo do efeito matriz percentual possibilitam concluir que os pesticidas piretróides avaliados apresentaram considerável efeito matriz negativo. Devido a este fator, a quantificação deve ser realizada em soluções preparadas no extrato da uva.

Os valores de LOQ_m foram de 0,01 a 0,02 mg kg⁻¹ para todos os piretróides. Os valores de recuperação obtidos para os níveis de fortificação 0,02, 0,05 e 0,5 mg kg⁻¹ ficaram entre 94,3 e 115,2%, com boa precisão (RSD<18,4%), o que mostrou que o desempenho do método mini-Luke modificado empregado para as extrações é satisfatório.

Este estudo mostrou também, que o sistema GC×GC-μECD com modulador de duplo jato de ar comprimido tem potencial para aplicação nas análises de rotina de pesticidas piretróides em uva, uma vez que obteve-se baixos valores de LOD e LOQ, e boa precisão da resposta analítica.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Desenvolvimento e validação de métodos utilizando GC×GC com modulador a ar para separar e monitorar diferentes classes de pesticidas, tais como carbamatos, organofosforados e organoclorados na cultura da uva;

Aplicação do modulador desenvolvido neste trabalho na comparação de diferentes métodos de extração de pesticidas em diferentes culturas como, por exemplo, a utilização do método QuEChERS;

Utilização do sistema GC×GC com modulador a ar para identificação e quantificação de diferentes compostos em amostras complexas, tais como produtos petroquímicos e amostras ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAHCHOUR, M. **Design, optimization and use of GC×GC system for food analysis** 2006. 362 f. Tese de doutorado (Doutorado em Química) UVA, Amsterdam.

ADAHCHOUR, M. *et al.* Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection for the trace analysis of flavour compounds in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1019, p. 157-172, 2003.

ADAHCHOUR, M. *et al.* Fast comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) using 50- μ m ID second-dimension columns. **Journal of Separation Science**, v. 26, p. 753-760, 2003.

ADAHCHOUR, M. *et al.* Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC): II. Modulation and detection. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 438-454, 2006.

ADAHCHOUR, M. *et al.* Twin comprehensive two-dimensional gas chromatographic system: concept and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1086, p. 128-134, 2005.

AHMED, F. E.; Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. **Trends in Analytical Trends**, v. 20, p. 649-661, 2001.

ANASTASSIADES, M. *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 86, p. 412-431, 2003.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA) Brasília. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_pesquisa_ingrediente.asp>. Acesso em 17 outubro de 2007.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Classificação e Rotulagem de agrotóxicos. 2005. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/secex/ghs/curso>>. Acesso em 22 janeiro de 2007.

AUGUSTO, F.; ANDRADE, J. C.; CUSTÓDIO, R. Faixa linear de uma curva de calibração. Campinas, junho de 1997. Disponível em http://www.chemkeys.com/bra/ag/tda_8/flduc3/flduc3.htm#. Acesso em 17 de outubro de 2007.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004, p. 15-34.

BEENS, J. *et al.* Quantitative Aspects of Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography (GC×GC). **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 21, p. 47-54, 1998a.

BEENS, J. *et al.* Simple, non-moving modulation interface for comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 919, p. 127-132, 2001.

BEENS, J.; TIJSSEN, R.; BLOMBERG, J. Prediction of comprehensive two-dimensional gas chromatographic separations: A theoretical and practical exercise. **Journal of Chromatography A**, v. 822, p. 233-25, 1998b.

BERTSCH, W. Multidimensional gas chromatography. In: CORTES, H. J. (Ed.) **Multidimensional Chromatography. Techniques and Applications**. New York and Basel: Marcel Dekker Inc., 1990.

BERTSCH, W. Two-dimensional gas chromatography. Concepts, instrumentation, and applications-part 2: comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 23, p. 167-181, 2000.

BORDAJANDI, L. R.; RAMOS, L.; GONZALEZ, M. J. Chiral comprehensive two-dimensional gas chromatography with electron-capture detection applied to the analysis of chiral polychlorinated biphenyls in food samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1078, p. 128-135, 2005.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 jan 2002. Disponível em: <www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm>. Acesso em 23 novembro de 2006.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 junho 2003. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 17 junho de 2007.

BRUCKNER, C. A.; PRAZEN, B. J.; SYNOVEC, R. E. Comprehensive two-dimensional high-speed gas chromatography with chemometric analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 70, p. 2796-2804, 1998.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis - Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 175-180, 1997.

CHEN, Z. M.; WANG Y. H. Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 367-395, 1996.

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica em chama. **Química Nova**, v.24, p. 374, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS METHOD VALIDATION, JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME, **Codex on methods of analysis and sampling**, Budapeste, 2001.

COLUMÉ, A. *et al.* Semiautomatic multiresidue gas chromatographic method for the screening of vegetables for 25 organochlorine and pyrethroid pesticides. **Analytica Chimica Acta**, v. 436, p. 153-162, 2001.

DALLÜGE, J.; BEENS, J.; BRINKMAN, U. A. Th. Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 69-108, 2003.

DIÉZ, C. *et al.* Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1131, p. 11-23, 2006.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA), Atuação do Brasil no mercado vitivinícola mundial – Panorama 2006. EMBRAPA Uva e vinho, 2007. Disponível em <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicola_2006.pdf>. Acesso em 21 de agosto de 2007.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA), Pesticidas, Agricultura e Recursos Hídricos. EMBRAPA Agropecuária Oeste, 2006. Disponível em <<http://www.cpa0.embrapa.br/publicacoes/ficha.php?tipo=CT&num=12&ano=2006>>. Acesso em 12 de novembro de 2007.

FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations), 2005. Disponível em:

<<http://faostat.fao.org/faostat/collections?hasbulk=0&subset=FoodQuality&&language=EN>>. Acesso em 15 janeiro de 2007.

FRAGA, C. G.; PRAZEN, B. G.; SYNOVEC, R. E. Comprehensive two-dimensional gas chromatography and chemometrics for the high-speed quantitative analysis of aromatic isomers in a jet fuel using the standard addition method and an objective retention time alignment algorithm. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 4154-4162, 2000.

FRANCOTTE, E.; DAVATZ, A.; RICHERT, P. Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantitation of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester. **Journal of Chromatography B**, v. 686, p. 77-83, 1996.

GARP (ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS). **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos** (Apostila), p. 66-73, 1999.

GEUS, H. J.; BOER, J.; BRINKMAN, U. A. Th. Multidimensionality in gas chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 15, p. 168-178, 1996.

GAINES, R. B.; FRYSSINGER, G. S. Temperature requirements for thermal modulation in comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 27, p. 380-388, 2004.

GIDDINGS, J. C. Two dimensional separations. **Analytical Chemistry**, v. 56, p. 1258A-1270A, 1984.

GIDDINGS, J. C. Use of multiple dimensions in analytical separations. In: CORTES, H. J. (Ed.) **Multidimensional Chromatography. Techniques and Applications**. New York and Basel, Marcel Dekker Inc., 1990.

GÓRECKI, T. *et al.* Recent advances in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC). **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, p. 1077-1104, 2006.

Hajslová, J.; Zrostlíková, J. Matrix effects in (ultra) trace analyses of pesticides residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 181-197, 2003.

Harynuik, J.; Górecki, T. Design considerations for a GC×GC system. **Journal of Separation Science**, v. 25, p. 304-310, 2002.

Harynuik, J.; Górecki, T. New liquid nitrogen cryogenic modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1019, p. 53-63, 2003.

Harynuik, J.; Górecki, T.; Campbell, C. On the interpretation of GC×GC data. **LC-GC North America**, v. 20, p. 876-892, 2002.

Hiemstra, M.; de Kok, A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 3-25, 2007.

Huber, L. Validation of analytical methods: Review and strategy. **LC-GC Europe**, v. 11, p. 96-105, 1998.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL) **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasília, 2003. 35p.

International Conference on Harmonization (ICH); **Validation of analytical procedures: methodology, Q2B** (CPMP/ICH/281/95), 1995.

JOVER, E. *et al.* Characterization of lipids in complex samples using comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1086, p. 2-11, 2005.

KHUMMUENG, W. *et al.* Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography with nitrogen-selective detection for the analysis of fungicide residues in vegetable samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1131, p. 203-214, 2006.

KINGHORN, R. M.; MARRIOTT, P. J. High Speed Cryogenic Modulation - A Technology Enabling Comprehensive Multidimensional Gas Chromatography **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 22, p. 235-238, 1999.

KORYTÁR, P. *et al.* Group separation of organohalogenated compounds by means of comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1086, p. 29-44, 2005.

KORYTÁR, P. *et al.* High-resolution separation of polychlorinated biphenyls by comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 958, p. 203-218, 2002.

KRIJGSMAN, W.; KAMP, C. G. Analysis of organophosphorus pesticides by capillary gas chromatography with flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 117, p. 201-205, 1976.

KRISTENSSON, E. M. *et al.* Evaluation of modulators and electron-capture detectors for comprehensive two-dimensional GC of halogenated organic compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1019, p. 65-77, 2003.

KRISTENSSON, E. M.; **Miniaturised extraction methods for gas chromatography analysis of environmental and biotic samples** 2005. 192 f. Tese de doutorado (Doutorado em Química) UVA, Amsterdam.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: RiMa, 2004, 62p.

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. 1^a ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1999. 230 p.

LEDFOORD, E. B., Jr.; BILLESBACH, C. Jet-cooled thermal modulator for comprehensive multidimensional gas chromatography. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 23, p. 202-204, 2000.

LEHOTAY, S. J. *et al.* Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 88, p. 595-614, 2005.

LIBARDONI, M.; WAITE, J. H.; SACKS, R. Electrically heated, air-cooled thermal modulator and at-column heating for comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 2786-2794, 2005.

LIU, Z.; PHILLIPS, J. B. Comprehensive two-dimensional gas chromatography using an on-column thermal modulator interface. **Journal of Chromatography Science**, v. 29, p. 227-231, 1991.

LUKE, M.; FROBERG, J. E.; MASUMOTO, H. T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 58, pg. 1020-1026, 1975.

MARRIOTT, P.; SHELLIE, R. Principles and applications of comprehensive two dimensional gas chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, p. 573-583, 2002.

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

MICYUS, N. J.; McCURRY, J. D.; SEELEY, J. V. Analysis of aromatic compounds in gasoline with flow-switching comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1086, p. 115-121, 2005.

MÜHLEN, C. **Caracterização química de compostos nitrogenados do petróleo brasileiro e de óleos voláteis de plantas brasileiras usando cromatografia gasosa bidimensional abrangente** 2007. 210 f. Tese (Doutorado em Química) – UFRGS, Porto Alegre, RS.

MÜHLEN, C. *et al.* Caracterização de amostras petroquímicas e derivados utilizando cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC). **Química Nova**, v. 29, p. 765-775, 2006.

MÜHLEN, C. *et al.* Nomenclatura na língua portuguesa em cromatografia multidimensional abrangente. **Química Nova**, v. 30, p. 682-687, 2007a.

MÜHLEN, C. *et al.* Qualitative and quantitative study of nitrogen-containing compounds in heavy gas oil using two-dimensional gas chromatography with nitrogen phosphorus detection. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3223-3232, 2007b.

NETO, B. B. *et al.* Recomendações para calibração em química analítica – Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**, v. 25, p. 856-865, 2002.

PHILLIPS, J. B. *et al.* A robust thermal modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 22, p. 3-10, 1999.

PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: An overview. **Mass Spectrometry Reviews**, v.23, p. 45-85, 2004.

PICÓ, Y. *et al.* Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 117-131, 2007.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. D. Calibration: A review for analytical chemists. **Química Nova**, v. 19, p. 268-277, 1996.

PRESTES, O. **Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em arroz polido utilizando método QuEChERS modificado, clean-up dispersivo e GC-MS (NCI-SIM)** 2007. 117 f. Dissertação (Mestrado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

PURSCH, M. *et al.* Comprehensive two-dimensional gas chromatography using liquid nitrogen modulation: set-up and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1019, p. 43-51, 2003.

REDDY, M. C. *et al.* Identification and quantification of alkene-based drilling fluids in crude oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography with flame ionization detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1148, p. 100-107, 2007.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

ROZET, E. *et al.* Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of chromatography A**, v. 1158, p. 111-125, 2007.

RYAN, D.; MORRISON, P.; MARRIOTT, P. Orthogonality considerations in comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1071, p. 47-53, 2005.

SANCHES, S. M. *et al.* Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v.13, p.53-58, 2003.

SANNINO, A.; BANDINI, M.; BOLZONI, L. Determination of pyrethroid pesticide residue in processed fruits and vegetables by gas chromatography with electron detector capture and mass spectrometric detection. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.86, p. 101-108, 2003.

SCHOENMAKERS, P.; MARRIOTT, P.; BEENS, J. Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography. **LC-GC Europe**, v. 16, p. 1-4, 2003.

SEELEY, J. V.; KRAMP, F.; HICKS, C. J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography via differential flow modulation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 72, p. 4346 -4352, 2000.

SHELLIE, R. A.; MARRIOTT, P. J.; HUIE, C. W. Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) and GC×GC-quadrupole MS analysis of Asian and American ginseng. **Journal of Separation Science**, v. 26, p. 1185-1192, 2003.

SHELLIE, R. *et al.* Characterization of lavender essential oils by using gas chromatography–mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 970, p. 225-234, 2002.

SHELLIE, R.; MARRIOTT, P. J.; MORRISON, P. Concepts and Preliminary Observations on the Triple-Dimensional Analysis of Complex Volatile Samples by Using GC×GC-TOFMS. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 1336-1344.

SHENCK, F. *et al.* Comparison of magnesium sulfate and sodium sulfate for removal of water from pesticide extracts of foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 85, p. 1177-1180, 2002.

SHERMA, J. Pesticide residue analysis (1999-2000): A review. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 84, p. 1303-1312, 2001.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v.74, p. 835-855, 2002.

TORRES, C. M.; PICÓ, Y.; MANES, J. Determination of pesticide residues in fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 301-331, 1996.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), Definition of pesticides, 2007a. Disponível em <<http://entweb.clemson.edu/pesticid/Document/EPAdef.htm>>. Acesso em 30 de novembro de 2007.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), Permethrin, Resmethrin, Sumithrin: synthetic pyrethroids for mosquito control, 2007b Disponível em <<http://www.epa.gov/pesticides/health/mosquitoes/pyrethroids4mosquitoes.htm>>. Acesso em 30 de novembro de 2007.