



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

**COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO QuEChERS
E MINI-LUKE MODIFICADOS NA DETERMINAÇÃO DE
RESÍDUOS DE PESTICIDAS PIRETRÓIDES EM
TOMATE EMPREGANDO GC×GC-μECD**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Samile Martel

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO QuEChERS
E MINI-LUKE MODIFICADOS NA DETERMINAÇÃO DE
RESÍDUOS DE PESTICIDAS PIRETRÓIDES EM
TOMATE EMPREGANDO GC×GC-μECD**

por

Samile Martel

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: Prof. Dr. 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

**COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO QuEChERS
E MINI-LUKE MODIFICADOS NA DETERMINAÇÃO DE
RESÍDUOS DE PESTICIDAS PIRETRÓIDES EM
TOMATE EMPREGANDO GC×GC-μECD**

elaborada por

Samile Martel

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

Comissão Examinadora

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

Profa. Dra. Rosana de Cássia de Souza Schneider
Universidade de Santa Cruz do Sul

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

Santa Maria, 29 de agosto de 2008

”Envelheço quando me fecho para as
novas idéias e me torno radical;
quando o novo me assusta e minha
mente insiste em não aceitar;
quando me torno impaciente, intransigente
e não consigo dialogar;
quando meu pensamento abandona sua casa e
retorna sem nada acrescentar;
quando penso demasiadamente em mim mesmo
e conseqüentemente, dos outros
completamente me esqueço;
quando penso em ousar e já antevejo o
preço que terei que pagar, mesmo que os fatos
insistam em me contrariar;
quando permito que o cansaço e o
desalento tomem conta de minha alma e
ponho a me lamentar;
enfim quando paro de lutar”

Reinilson Câmara

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella agradeço o apoio neste trabalho, o incentivo e a amizade sempre. Agradeço pela oportunidade de poder ter convivido com esse grupo que é o LARP e também pela confiança quando me foi dada a oportunidade de desenvolver esse trabalho na *Free University*, em Amsterdã. Obrigada também pela compreensão e incentivo com relação ao meu ingresso na vida profissional.

À Profa. Dra. Martha Bohrer Adaime, quem me acompanhou desde o início da minha caminhada, ainda antes de ter ingressado no LARP, e acompanhou desde o início o desenvolvimento deste trabalho, iniciando comigo os primeiros rabiscos dessa dissertação. Agora posso dizer que será sempre meu exemplo, não apenas como profissional, mas principalmente como pessoa.

Ao Dr. René Vreuls e sua equipe da *Free University* em Amsterdã, Holanda, pelos ensinamentos e acolhida em seu grupo de pesquisa.

Ao Dr. Ubiratan Flores da Silva, Profa. Dra. Rosana de Cássia de Souza Schneider e Profa. Dra. Martha Bohrer Adaime pelas valiosas sugestões e comentários no exame de qualificação e na banca examinadora.

Aos funcionários do PPGQ, Ademir e Valéria, pela atenção e ajuda dispensada durante a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do LARP, agradeço por ter conhecido e convivido com cada um de vocês e por fazerem parte do meu dia-a-dia durante o tempo que permaneci no LARP. Nunca deixem que o tempo e a correria das nossas vidas apaguem as boas lembranças que temos uns dos outros.

À Carol e Osmar, companheiros e amigos de viagem, onde surgiu uma amizade sincera e que, a partir desse momento tornaram-se amigos que tenho certeza que permanecerão pra sempre em minha vida, independente do rumo que nossas vidas tomarem.

Às amigas Márcia e Sandra Botega agradeço pela prazerosa e sincera amizade, por estarem sempre por perto quando precisamos e sempre prontas a ajudar no que for preciso.

Aos amigos Márcia e Fábio, aos quais agradeço a maior parte dos conhecimentos que possuo, mas que, além disso, me mostraram uma amizade como poucas que existem. Apesar da distância, sempre ficarão as lembranças, a saudade e principalmente, a amizade.

Aos meus pais Ademar e Suelí e meus irmãos André e Daniel que eu sei que se preocupam e torcem por mim sempre, os quais mesmo distantes sempre se mostraram bastante presentes em minha vida. Obrigada pela força, compreensão e carinho. Agradeço em especial a minha mãe por nunca me deixar desanimar e por me mostrar quais são as coisas mais valiosas nessa vida.

A todos os demais familiares e amigos que de alguma forma torceram por mim e me apoiaram durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Deus, que sempre acreditei ser a base de tudo, agradeço pela capacidade de desenvolver este trabalho e por colocar tantas pessoas especiais em meu caminho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xvii
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Pesticidas e suas classificações.....	4
2.2 Pesticidas piretróides.....	8
2.2.1 Propriedades e aplicações.....	9
2.2.2 Classificação.....	10
2.2.3 Pesticidas estudados.....	11
2.2.3.1 Bifentrina.....	11
2.2.3.2 Ciflutrina.....	12
2.2.3.3 Esfenvalerato.....	13
2.2.3.4 Fenpropatrina.....	13
2.2.3.5 Fenvalerato.....	14
2.2.3.6 Permetrina.....	14
2.3 Tomate.....	15
2.3.1 Origem e histórico.....	15
2.3.2 Importância econômica e social.....	16
2.3.3 Composição química.....	17
2.3.4 Uso de pesticidas em tomate e Limites Máximos de Resíduos.....	18
2.4 Métodos de extração de resíduos de pesticidas.....	20

2.4.1 Fundamentos e importância.....	20
2.4.2 Principais métodos de extração.....	22
2.4.3 Métodos de extração Luke e mini-Luke.....	25
2.4.4 Método de extração QuEChERS.....	27
2.4.5 Comparação entre os principais solventes de extração.....	32
2.5 Métodos para determinação de resíduos de pesticidas empregando cromatografia gasosa.....	34
2.5.1 Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC×GC).....	36
2.5.1.1 Princípios da técnica GC×GC.....	36
2.5.1.2 Sistema de modulação.....	39
2.5.1.3 Detectores.....	42
2.5.1.4 Tipos de diagramas para visualização do sinal analítico.....	43
2.5.2 Aplicação da GC×GC na análise de resíduos de pesticidas.....	45
2.6 Validação de métodos cromatográficos.....	47
2.6.1 Curva analítica e linearidade.....	48
2.6.2 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	49
2.6.3 Precisão.....	50
2.6.4 Exatidão.....	51
2.6.5 Efeito matriz.....	51
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	53
3.1 Reagentes e solventes.....	53
3.2 Materiais.....	53
3.3 Pesticidas selecionados.....	54
3.4 Instrumentação.....	55
3.4.1 Instrumentação geral.....	55
3.4.2 Sistema cromatográfico GC×GC-μECD.....	55
3.5 Gases utilizados.....	56
3.6 Otimização do sistema GC×GC-μECD para determinação dos resíduos de pesticidas.....	56
3.6.1 Coluna cromatográfica e programação de temperatura do forno da coluna.....	56
3.6.2 Estudo da melhor vazão do gás de arraste.....	57

3.6.3 Sistema de injeção e de detecção.....	57
3.7 Preparo das soluções analíticas.....	58
3.7.1 Método QuEChERS modificado.....	58
3.7.2 Método mini-Luke modificado.....	59
3.8 Ensaios de fortificação e extração.....	59
3.8.1 Método QuEChERS modificado.....	60
3.8.2 Método mini-Luke modificado.....	63
3.9 Análise dos solventes e reagentes.....	66
3.9.1 Método QuEChERS modificado.....	66
3.9.2 Método mini-Luke modificado.....	67
3.10 Validação dos métodos de extração QuEChERS e mini-Luke modificados para análise de resíduos de pesticidas piretróides em tomate.....	67
3.10.1 Determinação da linearidade das curvas analíticas.....	68
3.10.2 Limite de detecção e limite de quantificação.....	68
3.10.3 Precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	69
3.10.4 Ensaios de fortificação para avaliação da recuperação (exatidão).....	70
3.10.5 Avaliação do efeito matriz.....	70
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	72
4.1 Condições cromatográficas otimizadas para análise dos resíduos de pesticidas por GC×GC-μECD.....	72
4.1.1 Coluna cromatográfica e programação de temperatura.....	72
4.1.2 Escolha da melhor vazão do gás de arraste.....	72
4.1.3 Condições cromatográficas.....	73
4.2 Análise de resíduos de pesticidas por GC×GC-μECD utilizando extração pelos métodos QuEChERS e mini-Luke modificados e utilizando o modulador com ar comprimido.....	74
4.2.1 Análise dos solventes e reagentes pelos métodos de extração QuEChERS e mini-Luke modificados.....	77
4.3 Validação dos métodos de extração para análise de resíduos de pesticidas em tomate.....	77
4.3.1 Linearidade das curvas analíticas.....	77

4.3.1.1 Método QuEChERS modificado.....	77
4.3.1.2 Método mini-Luke modificado.....	78
4.3.2 Limite de detecção e quantificação.....	82
4.3.2.1 Método QuEChERS modificado.....	82
4.3.2.2 Método mini-Luke modificado.....	83
4.3.3 Precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	86
4.3.3.1 Método QuEChERS modificado.....	86
4.3.3.2 Método mini-Luke modificado.....	87
4.3.4 Recuperação dos analitos.....	88
4.3.4.1 Método QuEChERS modificado.....	89
4.3.4.2 Método mini-Luke modificado.....	92
4.3.5 Efeito matriz.....	94
4.3.5.1 Método QuEChERS modificado.....	94
4.3.5.2 Método mini-Luke modificado.....	97
4.4 Comparação entre os resultados obtidos pelo método QuEChERS e mini-Luke modificados.....	101
5. CONCLUSÃO.....	104
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fórmula estrutural do pesticida bifentrina.....	12
Figura 2.	Fórmula estrutural do pesticida ciflutrina	13
Figura 3.	Fórmula estrutural do pesticida esfenvalerato.....	13
Figura 4.	Fórmula estrutural do pesticida fenpropatrina	14
Figura 5.	Fórmula estrutural do pesticida fenvalerato.....	14
Figura 6.	Fórmula estrutural do pesticida permetrina	15
Figura 7.	Esquema de um sistema GC×GC (adaptado de DALLÜGE <i>et al.</i> , 2003; ADAHCHOUR <i>et al.</i> , 2006).....	38
Figura 8.	(A) Esquema de um modulador criogênico com duplo jato de CO ₂ líquido ou N ₂ gasoso frio, (B1-B3) Funcionamento de um modulador criogênico (adaptado de DALLÜGE <i>et al.</i> , 2003)	41
Figura 9.	(A) Esquema do modulador com duplo jato de ar comprimido, (B) representação tridimensional do modulador (FRIGGI, 2008).....	42
Figura 10.	Representações para o espaço de separação de uma análise realizada por GC×GC para uma amostra de óleo essencial 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> , 2007)	45
Figura 11.	Alguns equipamentos e materiais utilizados no método QuEChERS: (A) evaporador RapidVap, (B) centrífuga e (C) extrato da matriz em tubos de polipropileno com capacidade de 50 mL.....	61
Figura 12.	Esquema do método de extração QuEChERS modificado para análise de resíduos de pesticidas em tomate.....	62
Figura 13.	Alguns equipamentos e materiais utilizados no método mini-Luke:	

	(A) banho de água para evaporação do solvente, (B) centrífuga e (C) extrato da matriz em erlenmeyer com tampa.....	64
Figura 14.	Esquema do método de extração mini-Luke modificado para análise de resíduos de pesticidas em tomate.....	65
Figura 15.	Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de LOD e LOQ.....	69
Figura 16.	Cromatograma em 1D da solução analítica 0,2 mg L ⁻¹ contendo uma mistura dos pesticidas estudados preparada em solvente, obtido com as condições descritas no item 4.1.3.....	74
Figura 17.	Cromatograma da solução analítica 0,5 mg L ⁻¹ , contendo uma mistura dos pesticidas estudados, preparada no extrato da matriz obtida pelo método QuEChERS modificado, conforme condições descritas no item 4.1.3 (A) visualização em 1D e (B) visualização em 2D.....	75
Figura 18.	Cromatograma da solução analítica 0,5 mg L ⁻¹ , contendo uma mistura dos pesticidas estudados, preparada no extrato da matriz e obtida pelo método mini-Luke modificado, conforme condições descritas no item 4.1.3 (A) visualização em 1D e (B) visualização em 2D.....	76
Figura 19.	Cromatogramas do “branco” do extrato da matriz obtidos por GC×GC-μECD utilizando: (A) método QuEChERS modificado e (B) método mini-Luke modificado.....	81
Figura 20.	Cromatogramas da solução analítica 0,5 mg L ⁻¹ , contendo uma mistura dos pesticidas estudados, conforme condições descritas no item 4.1.3 (A) preparada no extrato da matriz pelo método QuEChERS modificado e (B) preparada em solvente (acetato de etila).....	83
Figura 21.	Cromatogramas da solução analítica 0,5 mg L ⁻¹ , contendo uma mistura dos pesticidas estudados, conforme condições descritas no item 4.1.3 (A) preparada no extrato da matriz pelo método mini-Luke modificado e (B) preparada em solvente (acetato de etila).....	85
Figura 22.	Cromatogramas do extrato da matriz “branco” fortificado ao nível	

de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com os pesticidas analisados por GC \times GC- μ ECD utilizando o método QuEChERS modificado, conforme condições descritas no item 4.1.3 (A) visualização em 1D e (B) visualização em 2D.....	91
Figura 23. Cromatogramas do extrato da matriz “branco” fortificado ao nível de 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com os pesticidas analisados por GC \times GC- μ ECD utilizando o método mini-Luke modificado, conforme condições descritas no item 4.1.3 (A) visualização em 1D e (B) visualização em 2D.....	93
Figura 24. Curva analítica do pesticida bifentrina preparado em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração QuEChERS modificado.....	95
Figura 25. Curva analítica do pesticida ciflutrina preparado em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração QuEChERS modificado.....	95
Figura 26. Curva analítica do pesticida fenpropatrina preparado em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração QuEChERS modificado.....	96
Figura 27. Curva analítica dos pesticidas fenvalerato e esfenvalerato preparados em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração QuEChERS modificado.....	96
Figura 28. Curva analítica dos pesticidas permetrina <i>cis</i> e <i>trans</i> preparados em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração QuEChERS modificado.....	97
Figura 29. Curva analítica do pesticida bifentrina preparado em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração mini-Luke modificado.....	98
Figura 30. Curva analítica do pesticida ciflutrina preparado em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração mini-Luke modificado.....	98
Figura 31. Curva analítica do pesticida fenpropatrina preparado em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração mini-Luke modificado.....	99

- Figura 32.** Curva analítica dos pesticidas fenvalerato e esfenvalerato preparado em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração mini-Luke modificado..... 99
- Figura 33.** Curva analítica dos pesticidas permetrina *cis* e *trans* preparado em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração mini-Luke modificado..... 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classes toxicológicas dos pesticidas de acordo com a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos.....	08
Tabela 2.	Área plantada, produção e produtividade média do tomate nas regiões brasileiras nas safras 2006 e 2007.....	17
Tabela 3.	Composição do tomate (variedade <i>Deborah</i>).....	18
Tabela 4.	Pesticidas analisados e Limites Máximos de Resíduos (MRLs) em tomate.....	19
Tabela 5.	Pesticidas analisados por GC×GC-μECD.....	54
Tabela 6.	Programas (P) de temperatura do forno da coluna utilizados na otimização da separação cromatográfica.....	57
Tabela 7.	Resultados obtidos para as curvas analíticas dos pesticidas em acetato de etila utilizando o método QuEChERS modificado.....	78
Tabela 8.	Resultados obtidos para as curvas analíticas dos pesticidas no extrato da matriz utilizando o método QuEChERS modificado....	78
Tabela 9.	Resultados obtidos para as curvas analíticas dos pesticidas em acetato de etila utilizando o método mini-Luke modificado.....	79
Tabela 10.	Resultados obtidos para as curvas analíticas dos pesticidas no extrato da matriz utilizando o método mini-Luke modificado.....	79
Tabela 11.	Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método no solvente e no extrato da matriz para os pesticidas estudados utilizando o método QuEChERS modificado.....	82
Tabela 12.	Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método no solvente	

	e no extrato da matriz para os pesticidas estudados utilizando o método mini-Luke modificado.....	84
Tabela 13.	Precisão do instrumento utilizando o método QuEChERS modificado.....	87
Tabela 14.	Precisão do instrumento utilizando o Método mini-Luke modificado.....	88
Tabela 15.	Recuperação, RSD_r e RSD_{pi} do método para os pesticidas utilizando o método QuEChERS modificado.....	89
Tabela 16.	Recuperação, RSD_r e RSD_{pi} do método para os pesticidas utilizando o método mini-Luke modificado.....	92
Tabela 17.	Comparação entre os métodos de extração utilizados: QuEChERS e mini-Luke modificados	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- μ ECD - micro Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *micro-Electron Capture Detection*
- 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
- C₁ - Concentração determinada na amostra fortificada
- C₂ - Concentração determinada na amostra não fortificada
- C₃ - Concentração usada para fortificação
- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
- C₁₈ - Octadecilsilano
- DL50 - Dose Letal 50%
- Dispersive-SPE - Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês *Dispersive-Solid Phase Extraction*.
- ECD - Detector por Captura de Elétrons, do inglês *Electron Capture Detector*
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EPA - Agência de Proteção Ambiental, do inglês *Environmental Protection Agency*
- FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
- FDA - Food and Drug Administration
- FID – Detecção por Ionização de Chama, do inglês *Flame Ionization Detection*
- FPD - Detecção por Fotometria de Chama, do inglês *Flame Photometric Detection*

- GARP - Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas
- GC - Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*
- GC×GC - Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente, do inglês *Comprehensive two-Dimensional Gas Chromatography*
- GC×GC-μECD - Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplada ao micro Detector por Captura de Elétrons, do inglês *Comprehensive two-Dimensional Gas Chromatography with micro-Electron Capture Detection*
- 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*
- HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*
- IDA - Ingestão Diária Aceitável
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia
- 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
- LOQ_i - Limite de Quantificação do Instrumento
- MRL - Limite Máximo de Resíduo, do inglês *Maximum Residue Limit*
- MRMs - Métodos Multirresíduos, do inglês *Multiresidue Methods*
- 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*
- p.c. – peso corpóreo
- PSA - Amina Primária Secundária, do inglês *Primary Secondary Amine*
- PTFE - Politetrafluoretileno - 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

R - recuperação

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*

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 Vôo, do inglês *time-of-flight mass spectrometer*

VWA - *Food and Product Safety Authority*

x_i - valores individuais

x_m - média das medidas em replicatas

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

RESUMO

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

COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO QUECHERS E MINI-LUKE MODIFICADOS NA EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS PIRETRÓIDES EM TOMATE EMPREGANDO GC×GC-μECD

AUTOR: SAMILE MARTEL
ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de agosto de 2008

Nesse estudo comparou-se dois métodos bastante utilizados na extração de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais, o método QuEChERS e o método mini-Luke, de modo a otimizar e validar estes métodos utilizando quantificação por GC×GC-μECD. Este estudo foi realizado para os pesticidas bifentrina, ciflutrina, fenpropatrina, fenvalerato, esfenvalerato e permetrina *cis* e *trans* em tomate. No método QuEChERS adicionou-se 10 mL de acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético em 10 g de amostra. No método mini-Luke adicionou-se 30 mL de acetona, seguidos de 60 mL da mistura 1:1 (v/v) de éter de petróleo e diclorometano em 10 g de amostra. Ao empregar-se o método de extração com acetonitrila obteve-se recuperações entre 90,2 e 105,5% com RSD menor que 8,7%, enquanto que, utilizando o método de extração com acetona, as recuperações ficaram entre 86,2 e 110,8% com RSD menor que 9,0%. Em termos de limite de quantificação (LOQ) o método QuEChERS modificado apresentou valores entre 0,01 e 0,02 mg kg⁻¹, considerados mais satisfatórios que os obtidos pelo método mini-Luke modificado (LOQ entre 0,02 e 0,05 mg kg⁻¹), sendo que, neste caso, o valor de LOQ encontrado para ciflutrina não foi satisfatório, pois está acima do limite máximo de resíduos permitido pela ANVISA. Com relação aos valores de r^2 das curvas analíticas, percebeu-se que, utilizando o método QuEChERS modificado estes valores foram maiores ou iguais a 0,9992 e para o método mini-Luke modificado foram maiores ou iguais a 0,9955, ambos para as curvas no extrato da matriz, demonstrando, portanto, que o método QuEChERS modificado forneceu valores de r^2 mais apropriados. Além disso, o método QuEChERS mostrou ser um procedimento mais simples por utilizar agitação manual, podendo ser aplicado em qualquer laboratório ou a campo. Outra vantagem importante deste método é a menor quantidade de solvente utilizado. Este estudo mostrou também que o sistema GC×GC-μECD com modulador de duplo jato de ar comprimido possibilita a redução dos custos da análise e que esta combinação pode ser utilizada em análises de pesticidas piretróides em tomate, pois obteve-se valores satisfatórios de LOD e LOQ, com boa precisão e exatidão.

Palavras Chave: Métodos de extração; GC×GC; pesticidas; alimentos; multirresíduos

ABSTRACT

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

COMPARISON BETWEEN MODIFIED QUECHERS AND MINI-LUKE EXTRACTION METHODS IN PYRETHROID PESTICIDES RESIDUES EXTRACTION IN TOMATO USING GC×GC-μECD

AUTHOR: SAMILE MARTEL
ADVISOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA
Date and place: Santa Maria, August 29th, 2008

In this study, two methods frequently used in the extraction of residues of pesticides in fruits and vegetables, the QuEChERS method and the mini-Luke method, were compared in order to optimize and validate these methods using quantification by GC×GC-μECD. This study was carried out for the pesticides bifenthrin, cyfluthrin, fenpropathrin, fenvalerate, esfenvalerate and permethrin *cis* and *trans* in tomato. In the QuEChERS method, 10 mL of acetonitrile containing 1% (v/v) of acetic acid was added to 10 g of sample. In the mini-Luke method, 30 mL of acetone, followed by 60 mL of a 1:1 (v/v) mixture of petroleum ether and dichloromethane were added to 10 g of sample. In the extraction method with acetonitrile, recoveries between 90.2 and 105.5% were obtained with RSD values lower than 8.7%, whereas, using the extraction method with acetone, the recoveries were between 86.2 and 110.8% with RSD values lower than 9.0%. In terms of limit of quantification (LOQ), the QuEChERS method presented values between 0.01 and 0.02 mg kg⁻¹, considered more satisfactory than those obtained using the modified mini-Luke method (LOQ between 0.02 and 0.05 mg kg⁻¹), where the value of LOQ found for cyfluthrin was above of the maximum limit of residues allowed by ANVISA, and therefore unsatisfactory. The *r*² values from the analytical curves in the extract of the matrix were equal or higher than 0.9992 and 0.9955 for the modified QuEChERS method and the modified mini-Luke method, respectively, demonstrating that the modified QuEChERS method supplied more appropriate *r*² values. Moreover, the QuEChERS method is a simpler procedure as it utilizes manual agitation and can be employed in any laboratory or in the field. Another important advantage of this method is the lower amount of solvent used. This study also showed that the GC×GC-μECD system using a modulator of double compressed air jet reduces costs and can be used in analyses of pyrethroid pesticides in tomato, with satisfactory values of LOD and LOQ, good precision and accuracy.

Keywords: Methods of extraction; GC×GC; pesticides; foods; multiresidues

1. INTRODUÇÃO

Na análise de resíduos de pesticidas há a necessidade de uma etapa prévia de preparo da amostra devido à complexidade das matrizes, as concentrações extremamente baixas dos analitos, bem como a grande variedade de propriedades químicas destes. Devido a estes fatores, as interferências são problemas freqüentes que precisam ser considerados.

Desta maneira, os objetivos principais do preparo da amostra são remover interferentes da matriz aumentando assim, a seletividade do método; aumentar a concentração do analito, quando necessário, e fornecer um método robusto e reprodutível, o qual deve ser independente de variações no tipo de matriz. Um método de preparo da amostra ineficiente e incompleto pode resultar numa considerável restrição no resultado das análises e pode envolver um trabalho adicional significativo para os analistas (SMITH, 2003).

As técnicas mais eficientes para análise de pesticidas envolvem o uso de Métodos de Extração Multirresíduos (MRMs, do inglês *Multiresidue Methods*), que abrangem diferentes classes de pesticidas e que são alternativas para a alta demanda por análise de resíduos de pesticidas, pois representam um monitoramento mais rápido e eficiente, resultando em um aumento na produtividade dos laboratórios, bem como, uma redução dos custos de análise de pesticidas (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; HERNÁNDEZ *et al.*, 2006). Estes métodos para serem considerados ideais devem gerar bons resultados de recuperação para pesticidas de diferentes polaridades; devem ser seletivos, no sentido de evitar a presença de compostos interferentes da matriz no extrato final; devem separar os analitos da fase aquosa; além de serem de baixo custo e seguros em termos de resultados e toxicidade (MASTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004).

A escolha do solvente é um dos pontos fundamentais no desenvolvimento de um método de extração multirresíduos. Muitos aspectos devem ser considerados, incluindo: possibilidade de extração de um amplo espectro de pesticidas com diferentes polaridades; seletividade durante o procedimento de extração, partição e *clean-up*; capacidade de separação da água; baixo custo e baixa toxicidade (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Além disso, o solvente deve ser compatível com os

analitos e, se possível, compatível com o método cromatográfico empregado para evitar etapa de troca de solvente (MASTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004).

O método Luke, introduzido em 1975 por LUKE *et al.*, é um método multirresíduos de pesticidas bastante utilizado para o monitoramento de pesticidas em alimentos, estudos de avaliação de risco e análises de rotina em amostras não gordurosas, tais como frutas e vegetais. Neste método utiliza-se 100 g de amostra e 200 mL de acetona na etapa inicial de extração e uma mistura de éter de petróleo e diclorometano na etapa de partição, sendo utilizados 100 mL de cada um destes solventes. Para obter melhores recuperações para pesticidas polares, cloreto de sódio é adicionado na fase aquosa para garantir a transferência dos pesticidas para a fase orgânica. A água co-extraída ainda presente na fase orgânica é retirada, em seguida, com sulfato de sódio anidro (SCHENK *et al.*, 2002; DIÉZ *et al.*, 2006).

Nos anos 80, o procedimento de extração denominado mini-Luke, em função de utilizar menores quantidades de solvente, foi desenvolvido pelo Ministério da Agricultura da Holanda (*Food and Consumer Product Safety Authority*) e vem sendo utilizado até hoje (KOK *et al.*, 1987; HIEMSTRA & KOK, 2007).

O método de extração QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*) foi introduzido em 2003 por ANASTASSIADES *et al.* com a finalidade principal de superar limitações práticas de outros métodos de extração multirresíduos já existentes. O método QuEChERS tem as vantagens principais de ser um método rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, as quais são destacadas no próprio nome QuEChERS. Este método foi desenvolvido para amostras que possuem em sua composição mais de 75% de água (DÍEZ *et al.*, 2006).

O procedimento original consiste em pesar 10 g de amostra previamente homogeneizada em tubo de politetrafluoretileno (PTFE), adicionar 10 mL de acetonitrila, com agitação vigorosa, que pode ser manual ou utilizando vortex, por 1 minuto. Em seguida, adiciona-se 4 g de sulfato de magnésio e 1 g de cloreto de sódio, agitando por 1 minuto. O extrato é então centrifugado e transfere-se 1 mL deste extrato para outro tubo contendo uma mistura de 150 mg de sulfato de magnésio anidro e 25 mg do sorvente PSA (do inglês *Primary Secondary Amine*),. Agita-se novamente por 30 segundos e centrifuga-se (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). O sorvente PSA é bastante utilizado na etapa de *clean-up* em métodos de

extração de resíduos de pesticidas, é formado pelo grupo funcional N-propil etilenodiamino siloxano, sendo similar ao sorvente amino (NH_2).

Considerando a grande importância da escolha de um método de extração adequado para a análise de resíduos de pesticidas e a importância da otimização do método escolhido, de maneira que os resultados sejam os mais precisos e exatos possíveis, os objetivos principais deste trabalho são: (i) comparar dois métodos de extração bastante utilizados na extração de resíduos de pesticidas de amostras de frutas e vegetais, o método QuEChERS e o método mini-Luke e (ii) otimizar e validar estes métodos de extração utilizando análise por GC \times GC- μ ECD (do inglês *Comprehensive two-Dimensional Gas Chromatography with micro-Electron Capture Detection*) dos pesticidas piretróides bifentrina, ciflutrina, fenpropatrina, fenvalerato e esfenvalerato, e permetrina *cis* e *trans* em tomate.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pesticidas e suas classificações

Um país como o Brasil, com tantas variedades climáticas e geográficas, abriga uma diversidade enorme de insetos e plantas. Além das espécies nativas e cultivadas para fins comerciais, tanto para consumo interno como para exportação, historicamente muitas espécies vegetais foram introduzidas por colonizadores e imigrantes, sendo responsáveis pela introdução de diferentes espécies de predadores. Durante muitas décadas o Brasil teve sua economia baseada no setor primário de produção e, ainda hoje, ocupa uma posição de destaque no abastecimento mundial de cereais, frutas e outros produtos de origem vegetal sendo, portanto, o controle de pragas um desafio que persiste e tem se agravado ano após ano (VIEGAS JÚNIOR, 2003). Estes fatores têm levado à busca contínua por novos pesticidas cada vez mais eficientes, mas que também representem maior segurança ao homem e ao meio ambiente.

Desde o início de seu desenvolvimento, a produção agrícola está diretamente relacionada com a aplicação de substâncias químicas para controlar as pestes, que atacam os produtos agrícolas, prejudicando as colheitas. O uso de compostos químicos no controle de pragas não é, portanto, invenção da moderna indústria química, mas data do período clássico da Grécia e Roma, sendo que o mais antigo registro de uso de pesticida é atribuído aos sumérios que, em 2500 a. C., utilizavam enxofre para combater insetos. Mais tarde, os romanos modificaram a fórmula com a adição de óleo ao enxofre, utilizando a mistura como repelente de insetos. No ano 79 da Era Cristã, foi sugerido o uso do arsênio como inseticida, o qual foi utilizado pelos chineses no século XIV (BARBOSA, 2004).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*) dos Estados Unidos, um pesticida é qualquer substância ou mistura de substâncias com capacidade de prevenir, destruir, repelir ou atenuar qualquer peste. Estes podem ser classificados de acordo com o tipo de peste – algicidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, acaricidas, moluscocidas, nematocidas, ovicidas, entre outros. Além disso, podem ser incluídas substâncias desfolhantes, dessecantes ou reguladoras do crescimento de insetos e plantas (EPA, 2008a).

O *Codex Alimentarius* define pesticida como sendo toda e qualquer substância utilizada com o propósito de prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer peste, incluindo espécies indesejáveis de plantas, insetos ou animais, durante as etapas de produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento ou ração animal. O termo inclui substâncias utilizadas como reguladoras do crescimento das plantas, desfolhantes, dessecantes, ou inibidores de brotos, e substâncias aplicadas tanto antes como após a colheita, para proteger a mesma da deterioração durante o armazenamento e transporte. Já 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 desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002).

A agricultura é a maior usuária de pesticidas e o seu uso é a principal estratégia no campo para o combate e prevenção de pragas agrícolas. Tais produtos melhoram a produtividade agrícola, podendo, eventualmente diminuir os preços dos alimentos e da mão-de-obra (ROCHA *et al.*, 2004).

Com um número crescente de pessoas para alimentar, a solução mais viável para a agricultura parece ser aumentar a produtividade por hectare, já que o simples aumento da área cultivada causaria enorme impacto ambiental com graves conseqüências, uma vez que, mais florestas seriam derrubadas para dar espaço a campos cultivados. Portanto, esse aumento de produtividade tem sido conseguido através do desenvolvimento de novas tecnologias de cultivo e pelo uso de fertilizantes químicos e de agrotóxicos (BARBOSA, 2004).

Mesmo com os benefícios que trazem os pesticidas no controle das pragas, o problema de intoxicações por estes compostos preocupa as autoridades, principalmente pelo fato de que essas intoxicações acontecem pela ingestão gradativa destes produtos que contaminam a água, o solo e uma variedade de alimentos. O uso de muitos destes compostos foi proibido devido à constatação do efeito cumulativo e prejudicial, que ocorre pela transferência de pequenas quantidades ao longo das cadeias alimentares (JORGENSEN, 2001).

Os pesticidas podem ser encontrados em diferentes compartimentos ambientais e também nos alimentos. Nos alimentos, são provenientes da aplicação em lavouras. No ar, são originários principalmente dos procedimentos de pulverização na forma de aerossóis. No solo, podem ser encontrados após a aplicação destes nas lavouras ou devido ao derramamento ou descarte inadequado, que, por percolação, podem atingir lençóis de águas subterrâneas. Em águas superficiais podem ser originários do carregamento através de chuvas ou resultados do descarte de água de culturas irrigadas ou ainda devido a derramamentos (KOMATSU & VAZ, 2004).

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, quanto para o consumidor final, caso estes alimentos estiverem contaminados em níveis acima dos aceitáveis (FRIGGI, 2008).

A preocupação ambiental vem crescendo na comunidade científica e também na população em geral, aumentando progressivamente o cuidado por parte das pessoas que trabalham expostas a estes pesticidas, e também por parte de indústrias e órgãos governamentais na parte de produção e controle de resíduos de pesticidas, respectivamente.

Os riscos à saúde humana causados por estes compostos são variados e dependem de alguns fatores relacionados à exposição (como dose, duração e rota), além de sofrerem influência de acordo com idade, sexo, saúde, estilo de vida e nutrição do indivíduo exposto. Os efeitos da exposição podem ir desde alergia, comprometimento do fígado até ataque ao sistema nervoso e sistema reprodutor (PINTO *et al.*, 2007).

Os pesticidas podem ser classificados de diferentes maneiras, podendo ser de acordo com o emprego (inseticida, fungicida, herbicidas, entre outros), formulação (pó, granulado, suspensão, aerossol), modo de ação (sistêmicos ou de

contato), estrutura química (piretróides, organofosforados, organoclorados, entre outros) e toxicidade.

A principal classificação é quanto ao seu emprego: inseticidas (combatem os insetos), herbicidas (combatem as plantas daninhas), fungicidas (combatem os fungos), acaricidas (combatem os ácaros), moluscocidas (combatem os moluscos), roenticidas (combatem os roedores), bactericidas (combatem as bactérias) entre outros (BAIRD, 2002).

Quanto ao modo de ação, destacam-se os pesticidas sistêmicos e de contato. Os sistêmicos são aplicados durante a germinação, entram para o sistema vascular da planta e contaminam a polpa do alimento. Os pesticidas de contato, também chamados de protetores, são aplicados externamente, antes ou depois da colheita, e saem com uma boa lavagem.

Do ponto de vista da composição química, os pesticidas possuem uma enorme diversidade estrutural, mas muitos apresentam alguma característica em comum, sendo assim, classificados dentro de um mesmo grupo. Os grupos mais conhecidos são representados pelos organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretróides. Estes nomes estão relacionados com as características estruturais dos compostos, ou seja, com a natureza dos elementos químicos presentes em sua composição, além da maneira como tais elementos estão ligados entre si (BARBOSA, 2004).

A classificação quanto à toxicidade é fundamental para o conhecimento da toxicidade aguda ou crônica dos pesticidas, os quais, por sua própria natureza, são compostos potencialmente perigosos para a saúde humana. Entretanto, esse perigo varia muito de um composto para outro, assim como os efeitos que eles, ou qualquer substância química, podem causar em organismos vivos, incluindo o homem (BARBOSA, 2004). Uma medida freqüente para avaliar a toxicidade aguda de pesticidas e outras substâncias químicas é a Dose Letal 50% (DL₅₀). A DL₅₀ representa a quantidade (dose única) da substância necessária para matar 50% dos animais testados nas condições experimentais utilizadas, a qual varia muito com o tipo de composto. Para efeitos legais, os agrotóxicos, em razão do perigo que podem representar aos seres humanos, são agrupados em quatro classes toxicológicas, de acordo com a DL₅₀, conforme demonstrado na Tabela 1 (BARBOSA, 2004).

Tabela 1 – Classes toxicológicas dos pesticidas de acordo com a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos

Indicador de periculosidade	Classe toxicológica			
	I	II	III	IV
DL ₅₀ oral*	0-50	50-500	500-5000	>5000
DL ₅₀ inalação*	0-0,2	0,2-2	2-20	>20
DL ₅₀ dérmica*	0-200	200-2000	2000-20000	>20000

* Unidade: mg kg⁻¹

Fonte: BARBOSA, 2004

A identificação dos rótulos desses produtos é feita por meio de faixas coloridas, de acordo com características toxicológicas. Assim, os rótulos dos produtos da classe I possuem uma faixa vermelha, os quais são extremamente tóxicos. Os compostos pertencentes à classe II, identificados por uma faixa amarela são altamente tóxicos; já os da classe III são representados por uma faixa azul e são considerados mediamente tóxicos e os da classe IV representados pela cor verde são pouco tóxicos (SANCHES *et al.*, 2003).

Sabe-se que os pesticidas são extremamente úteis na produção agrícola e que há uma crescente demanda por novos produtos, pois os organismos desenvolvem resistência a tais compostos após certo tempo, no entanto, o seu uso deve ser corretamente orientado por profissionais da área, respeitando a legislação vigente e a saúde da população. Para estes fins, as pesquisas na área de pesticidas vêm caminhando na direção da obtenção de compostos cada vez menos tóxicos para os seres vivos (SANCHES *et al.*, 2003)

2.2 Pesticidas piretróides

Os piretróides são compostos sintéticos utilizados como inseticidas que agem de maneira similar as piretrinas, que são compostos naturais extraídos de plantas do gênero *chrysanthemum* (EPA, 2008b).

O estudo da composição química destas plantas começou logo no início do século XX e resultou na identificação de seis compostos estruturalmente relacionados e genericamente denominados piretrinas. Devido à complexidade estrutural desses compostos e à limitação nas técnicas de análise disponíveis, apenas na década de 70 é que mais detalhes estruturais das piretrinas foram elucidados (BARBOSA, 2004).

As piretrinas pertencem à classe química dos ésteres. São líquidas e oleosas e relativamente instáveis à luz, mesmo nas flores secas da planta. Em meio aquoso, são hidrolisadas tanto em meio ácido quanto básico (BARBOSA, 2004).

Uma vez conhecida a composição química das piretrinas e as limitações em relação à aplicação destes compostos devido à sua instabilidade, alguns químicos começaram a trabalhar no desenvolvimento de novos compostos, os piretróides, os quais possuem maior fotoestabilidade e ação inseticida, mas também maior toxicidade aos mamíferos (EPA, 2007).

Diferentemente das piretrinas naturais, que são ésteres formados apenas pelos elementos químicos carbono, hidrogênio e oxigênio, os piretróides possuem, em suas estruturas, elementos como cloro, bromo, nitrogênio e flúor (BARBOSA, 2004). Em 1953 foi desenvolvido o primeiro piretróide sintético, bioaletrina, o qual demonstrou uma maior atividade contra insetos com relação às piretrinas naturais, porém, ainda apresentava baixa fotoestabilidade. Em 1969, a bioresmetrima foi lançada, sendo um composto potente contra uma ampla faixa de espécies de insetos, entretanto, ainda apresentava a fotoestabilidade semelhante às piretrinas. Sete anos depois, o primeiro piretróide fotoestável foi descoberto, o fenvalerato. Em seguida, diversos piretróides passaram a ser comercializados, entre eles, permetrina, cipermetrina e deltametrina, todos por volta do ano de 1977 (CHEN, 1996).

2.2.1 Propriedades e aplicações

Os piretróides são compostos praticamente insolúveis em água e bastante solúveis em solventes orgânicos. São compostos pouco persistentes no meio ambiente, podendo ser classificados, de uma maneira geral, como não persistentes. Estes compostos são mais resistentes ao meio ácido do que ao meio alcalino, com

uma estabilidade ótima a pH 4, sendo que em meio alcalino são decompostos por hidrólise (LARINI, 1999).

O sucesso comercial dos piretróides deveu-se a sua ampla variedade de atividades, agindo contra a maioria dos grupos de insetos-praga, sua ação rápida, baixa dosagem necessária e baixo risco para os usuários quando comparado a outros inseticidas (BARBOSA, 2004). Apesar da baixa toxicidade verificada para mamíferos, estudos toxicológicos feitos com 243 pesticidas mostraram que os piretróides estão entre os pesticidas mais tóxicos para organismos aquáticos, como peixes e crustáceos e também para abelhas (LINDERS *et al.*, 1994). Portanto, o uso indiscriminado de piretróides pode afetar drasticamente o equilíbrio no meio ambiente, sendo importante seu monitoramento através da análise de seus resíduos em diversas matrizes (BARRINUEVO & LANÇAS, 2001).

Os piretróides persistem nas plantações entre 7 e 30 dias, e como os resíduos são degradados a produtos normalmente polares (solúveis em água), eles não se acumulam na cadeia alimentar, como ocorre com os organoclorados (BARBOSA, 2004).

Os compostos piretróides são usados na agricultura, em cultivo de algodão, arroz, café, soja, milho, trigo, tomate e fumo e na medicina veterinária na eliminação de ectoparasitas de animais pequenos e em bovinos. São também empregados em campanhas de saúde pública na erradicação de mosquitos, no armazenamento de grãos e em uso doméstico para eliminação de insetos em geral. São disponíveis em formulações do tipo concentrado emulsionável, ultra-baixo-volume, aerossóis, pós, loções e xampus (LARINI, 1999).

2.2.2 Classificação

Os piretróides são classificados em dois diferentes tipos, de acordo com sintomas e sinais clínicos, para melhor entendimento de sua ação tóxica. Esta divisão é baseada na presença ou não do grupo ciano (CN) nas moléculas. Os piretróides do tipo A não contêm o grupo ciano, ao contrário dos compostos do tipo B que possuem esse grupo em sua estrutura (ANVISA, 2008a).

Os piretróides do tipo A são compostos que geram, experimentalmente em ratos, um quadro de tremores, hipersensibilidade e convulsões, sendo este grupo

conhecido por “síndrome T”, pela prevalência de tremores. Exemplos de pesticidas pertencentes a esse grupo são: aletrina, permetrina, resmetrina e fenotrina (ANVISA, 2008a; LARINI, 1999).

Os piretróides do tipo B mostram efeitos como coreoatetose (movimento involuntário), salivação excessiva, lacrimejamento, hipersecreção nasal, hipersensibilidade, distúrbios sensoriais cutâneos (formigamento, entorpecimento e sensação de queimação), irritação cutânea, perda de apetite, fadiga, tonturas, perda da consciência e convulsões. A intoxicação causada por estes compostos é conhecida como “síndrome CS”, pela prevalência de coreoatetose e salivação excessiva (ANVISA, 2008a; LARINI, 1999).

Com relação aos pesticidas estudados neste trabalho, classificam-se no grupo A os pesticidas bifentrina e permetrina, por não apresentarem o grupo ciano, por outro lado, os pesticidas ciflutrina, esfenvalerato, fenvalerato e fenpropatrina apresentam o grupo ciano em sua estrutura, pertencendo, portanto, ao grupo B.

2.2.3 Pesticidas estudados

Algumas propriedades e a fórmula estrutural dos pesticidas piretróides, bifentrina, ciflutrina, esfenvalerato, fenpropatrina, fenvalerato e permetrina *cis* e *trans*, estudados neste trabalho, estão demonstradas a seguir.

2.2.3.1 Bifentrina

O pesticida bifentrina (2-methylbiphenyl-3-ylmethyl (Z)-(1RS,3RS)-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate) pertence à classe de inseticida, formicida e acaricida. Sua fórmula estrutural está demonstrada na Figura 1. Com relação à classificação toxicológica é classificado como altamente tóxico, ou seja, pertence à classe II (ANVISA, 2007).

É um pesticida autorizado para o uso na aplicação foliar nas culturas de algodão, citros, couve, crisântemo, feijão, fumo, manga, mamão, melão, pepino, rosa, soja, tomate e uva. Além disso, é usado em arroz, milho e trigo armazenados, é aplicado no solo na cultura de cana-de-açúcar e no controle de formigas. A

Ingestão Diária Aceitável (IDA) deste pesticida é de $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso corpóreo (p.c) (ANVISA, 2007). A IDA é a quantidade do composto que uma pessoa pode consumir, diariamente, durante toda a sua vida, sem risco significativo à sua saúde e é determinada para cada ingrediente ativo de agrotóxico com base em estudos sobre as propriedades físico-químicas, metabólicas, farmacológicas e toxicológicas dos agrotóxicos, provenientes de estudos conduzidos com animais de laboratórios.

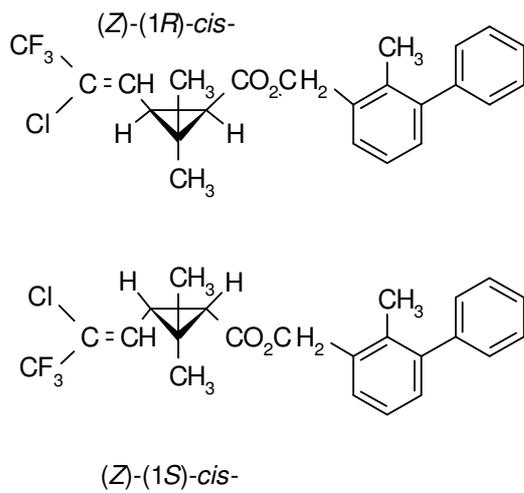


Figura 1 – Fórmula estrutural do pesticida bifentrina

2.2.3.2 Ciflutrina

O piretróide ciflutrina ((RS)- α -cyano-4-fluoro-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate)), pertencente à classe de inseticida e classificado toxicologicamente na classe II (altamente tóxico), é autorizado para o uso na aplicação foliar nas culturas de algodão, amendoim, arroz, café, feijão, fumo, soja, tomate e trigo. A IDA é de $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ p.c. (ANVISA, 2007). A fórmula estrutural do pesticida ciflutrina está demonstrada na Figura 2.

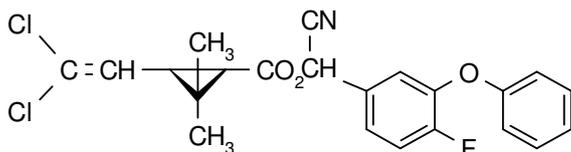


Figura 2 – Fórmula estrutural do pesticida ciflutrina

2.2.3.3 Esfenvalerato

O pesticida esfenvalerato ((S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (S)-2-(4-chlorophenyl)-3-methylbutyrate) é classificado como inseticida e pertencente toxicologicamente a classe II (altamente tóxico). A fórmula estrutural deste pesticida está demonstrada na Figura 3. Seu uso é autorizado na aplicação foliar nas culturas de algodão, arroz, café, cebola, crisântemo, feijão, fumo, milho, rosa, soja, tomate e trigo. A IDA é de $0,02 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c.}$ (ANVISA, 2007).

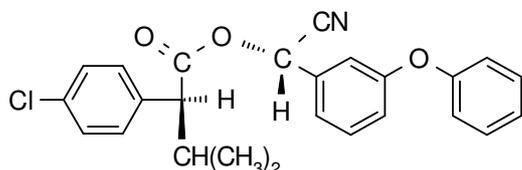


Figura 3 – Fórmula estrutural do pesticida esfenvalerato

2.2.3.4 Fenpropatrina

O piretróide fenpropatrina ((RS)- α -cyano-3-phenoxybenzyl 2,2,3,3-tetramethylcyclopropanecarboxylate) é classificado como inseticida e acaricida e também pertence toxicologicamente à classe II (altamente tóxico). É autorizado na aplicação foliar nas culturas de algodão, café, cebola, citros, crisântemo, feijão, gladiolo, maçã, mamão, morango, repolho, rosa, soja e tomate. O valor da IDA para este pesticida é de $0,03 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c.}$ (ANVISA, 2007). A Figura 4 demonstra a fórmula estrutural deste pesticida.

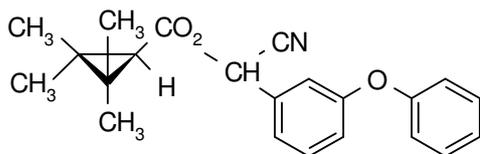


Figura 4 – Fórmula estrutural do pesticida fenproatrina

2.2.3.5 Fenvalerato

O piretróide fenvalerato ((*RS*)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (*RS*)-2-(4-chlorophenyl)-3-methylbutyrate) pertence à classe de inseticida e acaricida e também é classificado toxicologicamente como altamente tóxico, ou seja, pertence à classe II. Sua fórmula estrutural está demonstrada na Figura 5. É autorizado para o emprego domissanitário. O valor da IDA para este pesticida é de 0,02 mg kg⁻¹ p.c. (ANVISA, 2007).

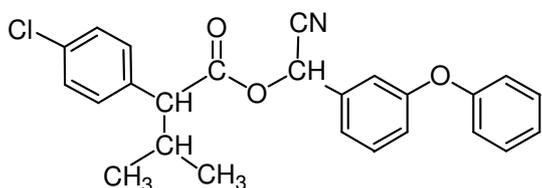


Figura 5 – Fórmula estrutural do pesticida fenvalerato

2.2.3.6 Permetrina

A permetrina (3-phenoxybenzyl (1*RS*,3*RS*;1*RS*,3*SR*)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate) é um piretróide pertencente à classe de inseticida e formicida. Quanto à classificação toxicológica está classificado como mediamente tóxico, ou seja, classe III (ANVISA, 2007). A Figura 6 demonstra sua fórmula estrutural.

É autorizado na aplicação foliar nas culturas de algodão, arroz, café, couve, couve-flor, fumo, milho, repolho, soja, tomate e trigo. Além disso, é usado na

aplicação em arroz, fumo, milho e trigo armazenados e no controle de formigas (ANVISA, 2007).

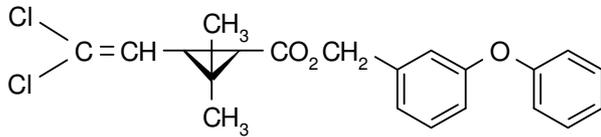


Figura 6 – Fórmula estrutural do pesticida permetrina

2.3 Tomate

2.3.1 Origem e histórico

Afirma-se que o tomate é nativo da Região Andina, na parte ocidental da América do Sul, e também da América Central, havendo discordâncias quanto ao seu país de origem. Muitos autores situam sua origem em países andinos como o Peru, a Bolívia e o Equador [FIGUEIRA, 1982].

A mais antiga descrição foi feita por Pietro Andréa Mattioli, em 1544, sendo que as primeiras plantas produziram frutos amarelos. Porém, a planta não foi difundida porque era considerada como extremamente venenosa, permanecendo como uma curiosidade botânica e como planta ornamental, devido aos belos frutos amarelos. O tomateiro foi mais aceito principalmente pelos espanhóis, que logo o introduziram em sua alimentação, mas mesmo assim, ficou restrito por quase dois séculos na região da Espanha [MINAMI & HAG, 1989].

A produção brasileira de tomate para industrialização começou em Pernambuco, no final do século XVIII. Porém, a cultura teve um grande impulso apenas a partir de 1950, no estado de São Paulo, viabilizando a implementação de diversas agroindústrias. Na década de 80, expandiu-se para a região nordeste, especialmente em Pernambuco e norte da Bahia [EMBRAPA, 2003]. O aumento verificado na produção de tomate no Brasil na década de 80 deveu-se ao estímulo das indústrias, que passaram por um crescimento acelerado, tanto na modernização

e aumento da capacidade das existentes, como na instalação de fábricas em áreas novas. Esse aumento no ramo industrial se deve às altas verificadas nos produtos processados de tomate no mercado internacional [MINAMI & HAG, 1989].

Atualmente, a maior área cultivada com tomate industrial está na região centro-oeste, onde o clima seco durante os meses de março a setembro favorece o cultivo do tomateiro [EMBRAPA, 2003].

2.3.2 Importância econômica e social

O tomate é um dos vegetais frescos mais consumidos no mundo, e também amplamente utilizado por indústrias de alimentos para a obtenção de produtos derivados. No Brasil, é um dos gêneros alimentícios mais consumidos por pessoas de todos os níveis sociais [TAVARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1994].

A cultura do tomate é uma das mais difíceis de conduzir para obtenção de resultados satisfatórios, pois é sensível a numerosas doenças, sua nutrição requer cuidados especiais e os frutos são de alta perecibilidade. Por isso, a produção é feita a custos elevados devido à necessidade de altas dosagens de adubo, irrigação pesada, controle semanal das doenças e pragas, entre outros [MINAMI & HAG, 1989].

O cultivo do tomateiro exige um alto nível tecnológico e intensa utilização de mão-de-obra. Apesar do elevado índice de mecanização nas operações de preparo de solo, adubação, irrigação e pulverização, é necessária intensa mão-de-obra na execução das tarefas de capina e colheitas manuais, o que dá a essa cultura elevada importância econômica e social [EMBRAPA, 2003].

A Tabela 2 mostra a área plantada, a produção e a produtividade média de tomate no país por região e o comparativo das duas últimas safras, onde se percebe que a produção nacional de tomate na safra 2007 apresentou ligeira queda em relação à safra 2006, segundo levantamento sistemático da produção agrícola, divulgado pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística).

Tabela 2 – Área plantada, produção e produtividade média do tomate nas regiões brasileiras nas safras 2006 e 2007

Regiões	Área plantada (ha)		Produção (t)		Produtividade (kg ha ⁻¹)	
	Safra 2006	Safra 2007	Safra 2006	Safra 2007	Safra2006	Safra 2007
Norte	1.042	1.042	8.113	7.984	8.065	7.936
Nordeste	13.047	12.292	517.784	494.366	39.823	40.219
Sudeste	24.281	22.298	1.569.765	1.417.711	64.725	63.884
Sul	8.204	7.530	393.132	419.888	47.978	55.769
Centro-Oeste	10.392	10.505	784.133	790.094	75.455	75.211
Total	56.966	53.667	3.272.927	3.130.043	57.574	58.479

Fonte: IBGE, 2007

2.3.3 Composição química

Quanto ao seu valor nutricional, o tomate não é das hortaliças mais ricas em proteínas, vitaminas e sais minerais, especialmente por conter entre 93 e 95% de água no fruto ao natural. Nos 5 a 7% restantes, encontram-se lipídeos, proteínas, açúcares, ácidos orgânicos, minerais e outros compostos [FIGUEIRA, 1982; EMBRAPA, 2003]. Todavia, por ser consumido em maior quantidade e com maior frequência em relação a outras hortaliças mais nutritivas, o tomate torna-se uma fonte importante de tais nutrientes na dieta dos brasileiros. Também contribui para isso, a forma como é consumido, geralmente em saladas, evitando-se as perdas ocasionadas pela cocção [FIGUEIRA, 1982]. A Tabela 3 contém dados sobre a composição do tomate, referente à variedade *Deborah*.

Tabela 3. Composição do tomate (variedade *Deborah*)

Composição	Valor médio (%)
Água	94,5
Açúcar	3,92
Proteínas	0,87
Lipídeos	0,12
Acidez titulável (% ácido cítrico)	0,28
Outros	0,31

Fonte: TONON *et al.*, 2006

2.3.4 Uso de pesticidas em tomate e Limites Máximos de Resíduos

Uma das maiores preocupações dos consumidores com relação ao uso de pesticidas nas lavouras é saber se os alimentos estão contaminados com resíduos tóxicos que possam fazer mal a saúde. Os princípios ativos destes produtos são desenvolvidos para serem aplicados nas lavouras, controlando o ataque de pragas e doenças e depois degradarem-se, de modo que o alimento colhido não esteja contaminado [ANDEF, 2008].

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 [BARBOSA, 2004].

O Limite Máximo de Resíduos é definido pela ANVISA como sendo a quantidade máxima de agrotóxico legalmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo. É expressa em miligramas de resíduos por quilograma de alimento (mg kg^{-1}) [ANVISA, 2006].

Pelo *Codex Alimentarius*, a definição é muito semelhante, sendo definido como a concentração máxima do resíduo de um pesticida (expresso em mg kg^{-1}) legalmente permitido no alimento ou na ração animal. Os valores de MRL para pesticidas, estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* são baseados em dados de resíduos, obtidos principalmente a partir de testes supervisionados. Esses dados obtidos podem variar consideravelmente de região para região, por apresentarem

diferentes necessidades para o controle local das infestações, resultando em diferentes quantidades e tipos de resíduos nos alimentos. Dessa maneira, o *Codex Alimentarius* considera o máximo possível essas variações para o estabelecimento de seus MRLs, desde que haja dados disponíveis que possam dar suporte a essa ação [FAO, 2005].

A cultura de tomate tem se tornado menos resistente a várias doenças e condições ambientais adversas, como resultado de processos empregados para aumentar a produtividade e qualidade desta cultura. Além disso, esta cultura, como tantas outras, tem se tornado muito dependente de intenso uso de pesticidas [ENGINDENIZ, 2006]. É importante ressaltar que o tomateiro pode receber diferentes tipos de pesticidas, entre sistêmicos e de contato.

Na Tabela 4 estão listados os valores de MRLs estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008b), *Codex Alimentarius* (2008) e pela União Européia (2008) para os compostos alvo deste estudo.

Tabela 4 - Pesticidas analisados e Limites Máximos de Resíduos (MRLs) em tomate

Pesticida	MRL (mg kg ⁻¹)		
	ANVISA	União Européia	Codex Alimentarius
Bifentrina	0,02	0,02	n.e.
Ciflutrina	0,02	0,05	0,5
Esfenvalerato e fenvalerato	0,2	n.e.	1
Fenpropatrina	0,05	0,05	n.e.
Permetrina <i>cis</i> e <i>trans</i>	0,3	0,05	1

n.e. = não estabelecido

2.4 Métodos de extração de resíduos de pesticidas

2.4.1 Fundamentos e importância

Métodos cromatográficos são amplamente utilizados para determinação de resíduos de pesticidas em amostras ambientais, sendo necessário utilizar diferentes métodos de preparo de amostra, os quais fazem uso de diferentes solventes, procedimentos e reagentes, cada método com suas vantagens e desvantagens. Mesmo assim, o preparo da amostra ainda é uma etapa da análise que, muitas vezes, recebe menos atenção em termos de pesquisa quando comparada aos métodos cromatográficos ou estágios de detecção (SMITH, 2003).

Na análise de resíduos de pesticidas, há a necessidade de uma etapa prévia de preparo da amostra, devido à complexidade das matrizes, as concentrações extremamente baixas dos analitos, bem como, a grande variedade de propriedades químicas por eles apresentadas. Devido a estes fatores, as interferências são problemas freqüentes que precisam ser considerados.

Desta maneira, o objetivo principal do preparo da amostra é converter uma matriz real em uma amostra disponível para análise por cromatografia ou outras técnicas analíticas. Além disso, o preparo da amostra deve remover interferentes da matriz, aumentando assim, a seletividade do método, deve aumentar a concentração do analito, quando necessário, e fornecer um método robusto e reprodutível, o qual deve ser independente de variações no tipo de matriz (SMITH, 2003).

O emprego de um método de extração adequado pode ser muito valioso e importante. Uma técnica ineficiente e incompleta pode resultar numa considerável restrição no resultado das análises e pode envolver um trabalho adicional significativo para os analistas (SMITH, 2003).

Análises de resíduos de pesticidas em alimentos e amostras ambientais vêm sendo realizadas em várias instituições governamentais, universidades e laboratórios privados em todo o mundo há mais de 40 anos. No entanto, os métodos utilizados para análise estão ainda longe de serem considerados ideais. Alguns laboratórios de monitoramento de resíduos de pesticidas continuam utilizando métodos desenvolvidos há 30 anos atrás, quando as necessidades e tecnologias eram bastante diferentes (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

As técnicas mais eficientes para análise de pesticidas envolvem o uso de Métodos de Extração Multirresíduos, que abrangem diferentes classes de pesticidas e que são alternativas para a alta demanda por análise de resíduos de pesticidas, pois representam um monitoramento mais rápido e eficiente, resultando em um aumento na produtividade dos laboratórios, bem como, uma redução dos custos de análise de pesticidas (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; HERNÁNDEZ *et al.*, 2006). Estes métodos para serem considerados ideais devem gerar bons resultados de recuperação para um amplo espectro de pesticidas de diferentes polaridades; devem ser seletivos, no sentido de evitar a presença de compostos interferentes da matriz no extrato final; devem separar os analitos da fase aquosa; além de serem de baixo custo e seguros em termos de resultados e toxicidade (MASTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004).

As matrizes mais analisadas em laboratórios de rotina são produtos agrícolas, como frutas, vegetais e grãos, os quais podem apresentar diferentes tipos de pesticidas, percebendo-se, dessa maneira, a grande importância de desenvolver métodos de análise multirresíduos de pesticidas. No entanto, as principais adversidades a serem encontradas no desenvolvimento destes métodos são as diferenças de propriedades químicas entre os analitos e a diversidade e complexidade das matrizes onde estes podem estar presentes (LEHOTAY, 2002). No geral, a complexidade da matriz resulta em efeitos adversos à análise, necessitando uma etapa de *clean-up* antes da análise cromatográfica para remoção de componentes indesejáveis presentes na matriz. No entanto, esta etapa adicional pode resultar em pequenas perdas do analito e aumentar o tempo e custo da análise, além do fato de que etapas adicionais levam a fontes de erros adicionais (LEHOTAY, 2000).

Em geral, um método de extração para ser considerado adequado deve apresentar as seguintes propriedades: boa precisão, boa robustez, recuperações próximas a 100% (boa exatidão), baixo custo, deve ser um método rápido, fácil e seguro. É muito importante também que o método inclua o maior número de pesticidas possíveis e remova os possíveis interferentes provenientes da matriz (HERCEGOVÁ *et al.*, 2007).

A escolha do solvente também é um dos pontos fundamentais no desenvolvimento de um método de extração multirresíduos. Muitos aspectos devem ser considerados, incluindo: possibilidade de extração de um amplo espectro de

pesticidas com diferentes polaridades; apresentar seletividade durante o procedimento de extração, partição e *clean-up*; capacidade de separação da água; apresentar baixo custo e baixa toxicidade (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Além disso, o solvente deve ser compatível com os analitos em questão e, se possível, compatível com o método cromatográfico empregado para evitar etapa de troca de solvente (MASTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004).

Normalmente, a maneira mais simples de melhorar a eficiência de um método analítico é reduzir a quantidade de amostra utilizada para uma quantidade mínima, que gere resultados estatisticamente satisfatórios. Os métodos que utilizam quantidades excessivas de amostra requerem maiores volumes de solvente e conseqüentemente geram mais resíduos e gastos que o necessário (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

As tendências para os próximos anos, no que diz respeito a métodos multirresíduos, é o uso de quantidades iniciais de amostras cada vez menores, técnicas mais seguras e menos agressivas ao meio ambiente, técnicas mais rápidas e menos laboriosas, mantendo altos valores de recuperação e boa precisão (HERCEGOVÁ *et al.*, 2007).

2.4.2 Principais métodos de extração

O primeiro importante método multirresíduos para extração de pesticidas foi desenvolvido por MILLS *et al.* (1963) nos laboratórios do U.S. Food and Drug Administration (FDA). Este método comumente chamado de método Mills, faz uso de acetonitrila como solvente de extração e era utilizado basicamente na extração de pesticidas organoclorados apolares, provenientes de extratos de alimentos não gordurosos. Água e sais eram adicionados ao extrato, e depois realizava-se uma etapa de partição pela adição de solventes apolares, como éter de petróleo ou hexano. Em seguida, água e componentes da matriz eram separados do extrato utilizando uma etapa de *clean-up* (DÍEZ *et al.*, 2006; ANASTASSIADES, *et al.*, 2003).

A partir do momento que mais pesticidas polares foram sendo desenvolvidos, novos métodos foram surgindo (SCHENK *et al.*, 2002; DÍEZ *et al.*, 2006). Em 1975, LUKE *et al.* desenvolveram o chamado método Luke, o qual faz uso de acetona

como solvente de extração, seguida de uma etapa de partição pela adição dos solventes apolares, éter de petróleo e diclorometano (DÍEZ *et al.*, 2006; SCHENCK *et al.*, 2002).

KRIJGSMAN & KAMP (1976) introduziram o método de acetato de etila como uma alternativa para o método Luke na extração de pesticidas provenientes de amostras não gordurosas. Este método apresentou maior rapidez, simplicidade e limpeza dos extratos, quando comparado ao método Luke, além de resultados satisfatórios de recuperação. Estas vantagens fizeram deste método, um método de extração oficial usado por algumas agências reguladoras européias. O método de acetato de etila envolve uma extração com este solvente seguida da adição de sulfato de sódio e uma etapa de *clean-up* utilizando cromatografia por permeação em gel (GPC, do inglês *Gel Permeation Chromatography*). Uma das desvantagens deste método é a redução na eficiência de extração de pesticidas polares, quando comparado ao método Luke, e também a quantidade de co-extrativos apolares provenientes da matriz (DÍEZ *et al.*, 2006).

Mais tarde, foi desenvolvido pelo *Food and Consumer Product Safety Authority* (VWA) em Amsterdã, Holanda, um procedimento de extração denominado mini-Luke. Neste método utilizam-se 30 mL de cada solvente: acetona, éter de petróleo e diclorometano (KOK *et al.*, 1987).

Durante os anos 90, ocorreu um intenso desenvolvimento de métodos alternativos de extração, os quais proporcionaram uma diminuição nas etapas durante o procedimento de preparo da amostra e uma redução no volume de solvente utilizado, resultando em uma menor quantidade de resíduos gerados (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; RODRIGUEZ *et al.*, 2003). Dentre estes procedimentos podemos citar a extração em fase sólida (SPE, do inglês, *solid phase extraction*), dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *matrix solid phase dispersion*), extração por fluido supercrítico (SFE, do inglês *supercritical fluid extraction*), micro extração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid phase micro extraction*) e mais recentemente, a extração sortiva com barra magnética (SBSE, do inglês *stir bar sortive extraction*).

As principais desvantagens destas técnicas são o baixo número de pesticidas que podem ser extraídos e também a limitada quantidade de amostra que pode ser empregada. Como a extração é muitas vezes automatizada, é necessário, na maioria dos casos, manutenção dos instrumentos, que podem resultar em altos

custos, e etapas de limpeza constantes antes de uma nova operação, o que muitas vezes resulta em um maior tempo de análise (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Em 2003, ANASTASSIADES *et al.* publicaram um método de extração multirresíduos chamado de QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), cujo nome reflete suas maiores vantagens. Este procedimento consiste na utilização de amostra previamente homogeneizada e a mesma quantidade de acetonitrila como solvente de extração. Neste método, o *clean-up* e a remoção de água são realizados simultaneamente utilizando um processo denominado Extração em Fase Sólida Dispersiva (dispersive-SPE, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*).

A adição de sais ("*salting out*") para iniciar e/ou influenciar o processo de partição líquido-líquido tem sido utilizada em vários métodos multirresíduos para análise de resíduos de pesticidas, pois dependendo da natureza do solvente utilizado na etapa de partição obtêm-se melhores resultados para analitos polares. Além disso, esta adição de sais também pode ser utilizada para controlar a quantidade de água na fase orgânica (SCHENCK *et al.*, 2002).

Atualmente, os métodos multirresíduos mais comumente utilizados para análises de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais envolvem uma extração inicial com acetona, acetonitrila ou acetato de etila. Cada um destes solventes de extração tem suas vantagens e desvantagens em termos de seletividade e eficiência, dependendo principalmente das características dos pesticidas em análise e do tipo de matriz onde estes pesticidas serão analisados (HIEMSTRA & KOK, 2007).

Os métodos de extração multirresíduos podem ser afetados por uma variedade de fatores, incluindo: características da amostra (pH, quantidade de água, lipídeos, açúcares); solvente utilizado para extração; razão amostra/solvente; procedimento de extração (método de agitação, por exemplo); temperatura de extração; princípio de partição (adição ou não de solventes apolares e/ou sais); tempo gasto nas etapas de agitação, número de repetições e materiais utilizados na etapa de *clean-up*. MRMs possuem muitas etapas analíticas, portanto, uma grande possibilidade de gerar erros. A chance de cometê-los aumenta à medida que aumenta o número de etapas em um método. Com base nisto, a tendência é o desenvolvimento de métodos simples e com o mínimo de etapas possíveis (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

2.4.3 Métodos de extração Luke e mini-Luke

O método Luke é um método multirresíduos de pesticidas bastante utilizado para o monitoramento de alimentos, estudos de avaliação de riscos e análises de rotina em amostras não gordurosas, tais como frutas e vegetais.

No método de extração Luke, introduzido por LUKE *et al.* (1975) utiliza-se 100 g de amostra, 200 mL de acetona na etapa inicial de extração e uma mistura de éter de petróleo e diclorometano na etapa de partição, sendo utilizados 100 mL de cada um destes solventes. Para obter melhores recuperações para pesticidas polares, cloreto de sódio é adicionado na fase aquosa para garantir a transferência dos pesticidas para a fase orgânica. A água co-extraída ainda presente na fase orgânica é retirada, em seguida, com sulfato de sódio anidro (SCHENK *et al.*, 2002; DIÉZ *et al.*, 2006).

Nos anos 80, o procedimento de extração denominado mini-Luke, em função de utilizar menores quantidades de solvente, foi desenvolvido pelo ministério da agricultura da Holanda (*Food and Consumer Product Safety Authority*) e vem sendo utilizado até hoje (KOK *et al.*, 1987; HIEMSTRA & KOK, 2007). O método consiste na análise de 15 g de frutas ou vegetais já processados, adicionando 30 mL de acetona seguido de agitação em homogeneizador por cerca de 30 segundos. Em seguida, 30 mL de éter de petróleo e 30 mL de diclorometano são adicionados, agitando-se novamente em homogeneizador por cerca de 1 minuto. A água co-extraída ainda presente na fase orgânica é retirada, em seguida, com sulfato de sódio anidro. O extrato é centrifugado e a parte líquida é transferida para frasco com tampa, sendo necessária etapa de evaporação antes da análise no sistema cromatográfico. A evaporação dos extratos é conduzida por um banho de água já aquecida a uma temperatura de 40 °C, sendo esta temperatura aumentada até 62 °C até quase secura total, e o restante do solvente é evaporado à temperatura ambiente (LEHOTAY *et al.*, 2005a).

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).

Desta maneira, desde a década de 80, o laboratório *Food and Consumer Product Safety Authority* tem aplicado a miniaturização do método de extração Luke original (LUKE *et al.*, 1975) onde não realiza-se a etapa de particionamento com cloreto de sódio, pois a adição dos solventes apolares (diclorometano e éter de petróleo) já é suficiente para uma separação bem definida entre a fase orgânica e a fase aquosa (HIEMSTRA & KOK, 2007).

Estudos realizados em 2002 por SCHENK *et al.*, demonstraram que o sulfato de sódio é muito menos eficiente na remoção de água residual de solventes orgânicos que o sulfato de magnésio, o qual vem sendo amplamente utilizado em estudos mais recentes (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Os solventes clorados, como é o caso do diclorometano utilizado no método Luke e mini-Luke, constituem um risco ambiental e por isso, um problema no momento do descarte, representando, portanto, uma importante desvantagem destes métodos (SCHENK *et al.*, 2002).

Os solventes miscíveis em água, como acetona e acetonitrila, extraem tanto pesticidas polares quanto apolares de matrizes não gordurosas, promovendo a extração em uma única fase quando em contato com a matriz. No entanto, devido à maior dificuldade em separar misturas de água e acetona em relação à separação de água e acetonitrila, há a necessidade de adição de solventes apolares em extrações com acetona para que ocorra a separação entre as fases, o que resulta em uma diluição do extrato (MAROVSKÁ, 2004; SCHENCK *et al.*, 2002).

Outra desvantagem deste método é o emprego de agitação mecânica durante o procedimento de extração, assim com a maioria dos outros métodos, sendo que o procedimento de agitação manual possui várias vantagens, como será descrito a seguir.

As maiores vantagens deste método de extração são a velocidade de extração, a limpeza relativa dos extratos, embora não seja aplicada uma etapa de *clean-up*, e a compatibilidade com ambas as classes de detectores, seletivos e espectrômetros de massas (HIEMSTRA & KOK, 2007).

2.4.4 Método de extração QuEChERS

O método de extração QuEChERS foi introduzido por ANASTASSIADES *et al.* (2003) com a finalidade principal de superar limitações práticas de outros métodos de extração multirresíduos já existentes. O método QuEChERS tem as vantagens principais de ser um método rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, as quais são destacadas no próprio nome QuEChERS. Este método foi desenvolvido para amostras que possuem em sua composição mais de 75% de água (DÍEZ *et al.*, 2006).

Durante o desenvolvimento deste método buscou-se a obtenção de um método simples, rápido, de baixo custo e com um número mínimo de etapas analíticas, utilizando pequenas quantidades de reagentes, e logicamente, com resultados satisfatórios de precisão e exatidão. O método desenvolvido tem a possibilidade de ser aplicado em qualquer laboratório, devido à simplificação de etapas lentas e trabalhosas (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Estas vantagens do método QuEChERS possibilitam a tendência do uso deste como um dos principais métodos empregados na análise de resíduos de pesticidas em alimentos infantis (HERCEGOVÁ *et al.*, 2007; LEANDRO *et al.*, 2006).

O procedimento original consiste em pesar 10 g de amostra previamente homogeneizada em tubo de PTFE (politetrafluoretileno) e adicionar 10 mL de acetonitrila, com agitação vigorosa, que pode ser manual ou utilizando vortex, por 1 minuto. Em seguida, adiciona-se 4 g de sulfato de magnésio e 1 g de cloreto de sódio, agitando por 1 minuto. O extrato é então centrifugado e transfere-se 1 mL deste extrato para outro tubo contendo uma mistura de 150 mg de sulfato de magnésio anidro e 25 mg de PSA. Agita-se novamente por 30 segundos e centrifuga-se (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

No método QuEChERS, uma combinação apropriada de sais gera uma separação de fases bem definida, não necessitando a adição de solventes orgânicos apolares, que resulta na diluição do extrato e possivelmente pode levar à uma menor recuperação de alguns analitos (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; MASTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004).

Quando se utiliza amostras com um conteúdo de água entre 25 e 80% é necessário adicionar água antes da extração inicial com acetonitrila para conseguir um total de cerca de 10 mL de água. Quando se utiliza amostras que possuem

menos de 25% de água em sua composição, como cereais, por exemplo, a quantidade de amostra utilizada pode ser reduzida (entre 1 e 5 g, por exemplo) e uma certa quantidade de água também deve ser adicionada antes da extração inicial com acetonitrila (QuEChERS, 2006).

Devido à simplicidade do método, o qual evita erros provenientes principalmente de múltiplas etapas, é necessário cuidado especial nas medidas de pequenos volumes, pois estes detalhes passam a ser importantes fontes de erro no método de preparo da amostra. Sendo assim, o analista precisa ter cuidado para evitar estas fontes de erro, utilizando pipetas, seringas e medidas volumétricas em geral apropriadas, especialmente quando não se utiliza padrão interno (LEHOTAY, 2007).

Com o emprego do método QuEChERS, recuperações entre 85 e 101% (sendo a maioria maior que 95%) e repetibilidades menores que 5% foram atingidas para uma ampla variedade de pesticidas fortificados, incluindo pesticidas muito polares. Utilizando este método, um único analista pode preparar 6 amostras previamente homogeneizadas em menos de 30 minutos, com custo aproximado de 1 dólar de materiais por amostra (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Um grande número de artigos sobre o método QuEChERS vem sendo publicado a cada ano e estas publicações indicam que diversos profissionais da área química em todo o mundo estão usando este método para análise de resíduos de pesticidas em alimentos. Além disso, algumas modificações do método também vêm sendo publicadas com o intuito de otimizar o processo de extração (LEHOTAY, 2007).

A fim de minimizar problemas de degradação de certos pesticidas, como por exemplo, folpete, captana e clorotalonil, durante a etapa de extração devido ao meio básico, uma etapa de tamponamento do extrato foi adicionada, o que promoveu uma melhora nos resultados obtidos para estes pesticidas. Para isso, um certo volume de ácido acético foi adicionado à acetonitrila utilizada para extração dos pesticidas. O método QuEChERS com etapa de tamponamento envolve a extração com acetonitrila contendo 1% de ácido acético (v/v) e partição líquido-líquido promovida pela adição de acetato de sódio e sulfato de magnésio, o qual é conhecido como método QuEChERS modificado (MASTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004; LEHOTAY *et al.*, 2005b). Com esta modificação do método QuEChERS obteve-se valores de

recuperações estáveis para pesticidas difíceis de serem analisados em diferentes tipos de matriz (LEHOTAY, 2005a).

Uma importante vantagem do método QuEChERS é a possibilidade de realizar a agitação da amostra manualmente, enquanto que a maioria dos métodos de extração emprega agitação mecânica. A agitação manual possui vantagens como: a amostra não é exposta a nenhuma superfície metálica, ao contrário de quando se utiliza um homogeneizador; possibilidade de realizar a extração em qualquer laboratório ou até mesmo a campo; maior rapidez, pois não há a necessidade de lavagem do homogeneizador entre uma amostra e outra; a extração é realizada em frasco que permanece fechado, resultando em um método mais seguro pela menor exposição do analista; menor custo, uma vez que não necessita de equipamento para agitação e, portanto, não há custos com manutenção deste (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Outras importantes vantagens deste método foram descritas por LEHOTAY *et al.* (2005a), entre as quais pode-se citar: altas recuperações (maiores que 85%) para um amplo espectro de pesticidas com diferentes polaridade e volatilidade, incluindo analitos difíceis de serem analisados; obtenção de resultados bastante precisos; menor quantidade de solvente é utilizado e conseqüentemente menor quantidade de resíduo é gerado, não havendo a utilização de solventes clorados; uma única pessoa pode realizar a extração sem a necessidade de muita habilidade ou treinamento; mesmo sendo um método rápido e fácil, é robusto o suficiente porque na etapa de *clean-up* são removidos ácidos graxos e outros ácidos orgânicos que são encontrados em alimentos; necessidade de um espaço muito pequeno para realizar o processo, podendo ser feito em um laboratório móvel, se necessário; a acetonitrila é adicionada utilizando dispensador em um frasco que é imediatamente fechado, portanto a exposição do analista ao solvente é mínima e somente um dólar de material é usado por 10 g de amostra.

Os métodos multirresíduos que utilizam acetonitrila como solvente de extração não empregam a adição de nenhum tipo de solvente apolar no processo de partição, uma vez que a adição de sais já é suficiente para promover a separação entre as fases. No método QuEChERS, após a extração inicial com acetonitrila, uma combinação dos sais sulfato de magnésio e cloreto de sódio é adicionada para induzir a separação das fases. A adição de cloreto de sódio resulta no aumento da recuperação de compostos polares. A adição de quantidades e combinações

apropriadas de sais pode ser usada para controlar a quantidade de água na fase orgânica. Esta adição de sais não é somente muito conveniente, rápida, fácil e de baixo custo, mas também tem a vantagem de não aumentar o volume do extrato, não precisando de uma etapa posterior de evaporação para concentrar a amostra (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; DÍEZ *et al.*, 2006).

O sulfato de magnésio anidro foi escolhido para ser utilizado no método QuEChERS por ser um agente secante muito mais eficiente quando comparado a outros sais, sendo sua hidratação um processo extremamente exotérmico, tendo como resultado um aquecimento do tubo utilizado entre 40-45 °C durante as etapas de extração/partição. Este aquecimento não é suficiente para volatilizar ou degradar os pesticidas, mas é favorável para extração de alguns pesticidas (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; LEHOTAY, 2000).

A utilização de acetonitrila tem algumas vantagens como, por exemplo, possibilitar a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos da amostra, como ceras, pigmentos e gordura. Além disso, este solvente também proporciona a extração de uma ampla faixa de pesticidas com diferentes polaridades, e quando acidificada permite recuperações satisfatórias de pesticidas que geralmente apresentam problemas de estabilidade (LEHOTAY, 2005).

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 menor que a relação obtida pela maioria dos outros métodos de extração, o que pode conduzir a valores de LOQ mais elevados para o mesmo volume de injeção no método QuEChERS (LEHOTAY *et al.*, 2005a).

Além disso, pelo fato de lipídeos não serem muito solúveis em acetonitrila e água, as gorduras geralmente formam um filme na superfície destes solventes ou uma emulsão durante a extração, portanto, pesticidas lipofílicos permanecem na gordura não dissolvida, o que resulta em recuperações mais baixas no extrato de acetonitrila. O nível de perdas depende da quantidade de lipídeos na amostra, bem como, da polaridade dos analitos. Se a quantidade de gordura na amostra é pequena, toda ou alta percentagem dessa gordura se dissolve na acetonitrila, resultando em recuperações mais altas para pesticidas lipofílicos. Por este fato, a acetonitrila não é muito útil para alimento com alto teor de gordura. No entanto, a acetonitrila pode ser utilizada para a extração de pesticidas lipofílicos de alimentos com baixo teor de gordura e na extração de pesticidas polares e pouco polares de

uma ampla variedade de alimentos gordurosos ou não (LEHOTAY, 2005; QuEChERS, 2006).

A etapa de *clean-up* é um aspecto crítico na análise de resíduos de pesticidas para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, uma vez que componentes não voláteis da matriz podem ficar retidos no conjunto injetor-insensor e também na coluna, reduzindo o desempenho do sistema e aumentando o número de manutenções do mesmo (HERCEGOVÁ *et al.*, 2007; SAITO *et al.*, 2004). Sendo assim, um novo método de *clean-up* foi desenvolvido juntamente com o método QuEChERS, o qual foi chamado de Extração em Fase Sólida Dispersiva (dispersive-SPE). Neste método, uma alíquota de 1 mL do extrato é colocada em contato com uma mistura contendo 25 mg do adsorvente PSA e 150 mg de sulfato de magnésio. Os sólidos são então separados por centrifugação ou filtração e uma alíquota do extrato final é levada para análise (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Algumas vezes, na etapa de *clean-up* do método QuEChERS é conveniente utilizar uma combinação de adsorventes, como por exemplo, octadecilsilano (C₁₈) e PSA, dependendo do tipo de matriz utilizada e das propriedades químicas dos pesticidas (LEHOTAY, 2005).

A extração em fase sólida dispersiva é baseada na extração em fase sólida (SPE), mas o adsorvente PSA é adicionado diretamente ao extrato, sem necessidade de condicionamento em cartuchos. A extração em fase sólida requer conhecimento da prática e da teoria da técnica e requer treinamento e atenção por parte do analista. Além disso, a SPE automatizada é relativamente cara e requer manutenção constante. Os fatores mais comuns que afetam a reprodutibilidade em SPE são as dificuldades com o ajuste do vácuo (portanto, com a vazão) e a secagem do adsorvente durante a extração (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Devido ao uso de pequenas quantidades de adsorvente e por não necessitar o uso de cartuchos, a dispersive-SPE é uma técnica que economiza tempo, dinheiro, trabalho e também quantidade de solvente, quando comparada à técnica de SPE. Não há a necessidade de nenhuma etapa de condicionamento de cartuchos, uma mínima atenção do analista é necessária e também não há problemas de secagem do adsorvente. Em dispersive-SPE todo o adsorvente interage com a matriz e uma ótima capacidade por miligrama de adsorvente é atingida (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

A mistura de sulfato de magnésio e PSA permite que a etapa de *clean-up* e a redução de água sejam efetuadas simultaneamente. Esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando assim a precipitação de co-extrativos polares. O adsorvente PSA, por sua vez, retém as interferências da matriz, removendo ácidos graxos, açúcares, alguns pigmentos e outros co-extrativos da matriz, sendo que depois de realizada uma etapa de agitação manual e centrifugação, o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Por outro lado, o PSA quando utilizado como adsorvente pode reter pesticidas contendo grupos de ácido carboxílico em sua estrutura, como 2,4-D, por exemplo, reduzindo o potencial de recuperação destes compostos (LEHOTAY, 2007).

Uma imperfeição do método QuEChERS original com relação à etapa de *clean-up* é que o PSA não remove de forma adequada a clorofila presente no extrato de alguns vegetais. O PSA retém ácidos graxos e outros ácidos orgânicos que estão presentes nos alimentos, mas a coloração verde proveniente da clorofila é apenas ligeiramente reduzida durante a etapa de *clean-up*. A clorofila pode acumular-se no sistema de injeção e aumentar a frequência de trocas do insersor e manutenção da coluna (LEHOTAY, 2005).

De fato, os métodos de extração multirresíduos possuem muitas etapas analíticas, portanto, uma grande possibilidade de gerar erros. No método QuEChERS, para minimizar a geração de erros, um padrão interno é freqüentemente adicionado ao processo. No método QuEChERS original foi utilizado trifenilfosfato como padrão interno por possuir propriedades adequadas para ser submetido à extração quantitativa para matrizes pouco gordurosas, não participando da etapa de partição na fase aquosa e não podendo ser retido durante a etapa de *clean-up*. Em um sistema formado por acetonitrila, água e sais, 98% deste padrão interno foi recuperado na fase orgânica, e 99% foi recuperado com a etapa de *clean-up* utilizando PSA (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

2.4.5 Comparação entre os principais solventes de extração

Acetonitrila, acetona e acetato de etila são os três solventes mais comumente usados para isolar e analisar resíduos de pesticidas provenientes de alimentos e

cada um deles tem suas vantagens e desvantagens em termos de seletividade e procedimento prático, sendo que todos têm demonstrado bons resultados de recuperação para uma ampla faixa de resíduos de pesticidas (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; MASTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004). Em contraste com acetona e acetonitrila, acetato de etila é praticamente imiscível com água, sendo que a água pode ser facilmente removida dos extratos utilizando um agente secante, geralmente sulfato de sódio (MASTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004).

Para induzir uma distinta separação da fase aquosa, acetona precisa da adição de solventes apolares, o que resulta em uma diluição do extrato e possivelmente perda de alguns analitos. No caso da acetonitrila, o uso de uma combinação apropriada de sais pode gerar uma separação de fases bem definida sem diluição e com ótimas recuperações para uma ampla faixa de pesticidas. Além disso, sulfato de magnésio anidro remove água residual da fase orgânica composta por acetonitrila com maior eficiência que no caso da acetona. Um simples experimento demonstrou que sulfato de magnésio é praticamente insolúvel em acetonitrila, entretanto, aproximadamente 13 mg de sulfato de magnésio podem ser dissolvidos em 1 mL de acetona à temperatura ambiente. Esta é uma consideração bastante importante, uma vez que os sais devem ser evitados em análise cromatográfica (MASTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004).

Em termos de seletividade de extração, acetonitrila isola muito menos compostos lipídicos provenientes da amostra em comparação com acetona e acetato de etila. Acetato de etila é mais eficiente para evitar a co-extração de açúcares, principalmente comparando com acetona (MASTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004).

Com relação à etapa de *clean-up*, acetato de etila é mais compatível com cromatografia por permeação em gel (GPC) para remoção de algumas moléculas lipofílicas e de pigmentos. Acetona e principalmente acetonitrila são solventes adequados para o uso de extração em fase sólida (SPE), a qual é preferível em relação ao uso de GPC, devido ao alto consumo de solvente nesta técnica (MASTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004).

Acetona tem um ponto de ebulição (56,1 °C) menor que acetato de etila e também acetonitrila (77 e 81,6 °C, respectivamente), conseqüentemente sua volatilidade à temperatura ambiente é também mais alta (CETESB, 2008). Em alguns casos, um solvente de maior volatilidade representa uma desvantagem no

processo de extração, porque o aumento da evaporação durante o preparo da amostra pode resultar em alterações no volume de extrato e uma maior exposição do analista aos vapores do solvente. Entretanto, se uma troca de solvente e/ou concentração do extrato é necessária, o uso de um solvente com maior volatilidade passa a ser vantajoso, no entanto, sempre que possível, é preferível evitar estas etapas (MASTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004).

Em termos de custos, acetonitrila é aproximadamente 1,4 e 1,7 vezes mais cara que um grau similar de acetato de etila e acetona, respectivamente. Acetonitrila é um solvente relativamente tóxico, mas seu impacto negativo em humanos e no ambiente é muito menor que no caso de solventes clorados (como diclorometano, por exemplo), os quais são ainda usados em práticas de rotina por alguns laboratórios (MASTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) acetonitrila não é classificada como uma substância cancerígena e não é persistente no ambiente (EPA, 2000). Além disso, sua volatilidade mais baixa reduz a exposição do analista, a qual pode ser minimizada seguindo procedimento de preparo apropriado (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

É importante ressaltar que a seleção de um ótimo solvente de extração para análise por cromatografia depende de muitos fatores, como por exemplo, a facilidade de extrair um amplo espectro de pesticidas, custos, toxicidade e seletividade durante o processo de extração e partição (MASTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004).

2.5 Métodos para determinação de resíduos de pesticidas empregando Cromatografia Gasosa

A determinação de pesticidas é um grande desafio considerando as baixas concentrações destes analitos presentes nos alimentos, as diferentes propriedades físicas e químicas, bem como a presença de altas concentrações de compostos interferentes (BIZIUK *et al.*, 1996). Mesmo assim, milhares de análises de resíduos de pesticidas em alimentos são realizadas em todo o mundo, todos os dias, com o objetivo de garantir a saúde da população e também garantir que o respectivo alimento atenda às exigências da legislação. As técnicas analíticas permitem a

quantificação dos resíduos em baixos níveis de concentração, fornecendo, muitas vezes, evidências para confirmar a identificação e a concentração dos resíduos detectados.

A Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) com sistemas clássicos de detecção como Captura de Elétrons (ECD, do inglês *Electron Capture Detection*), Nitrogênio-Fósforo (NPD, do inglês *Nitrogen and Phosphorus Detection*) e Fotometria de Chama (FPD, do inglês *Flame Photometric Detection*) ainda é amplamente utilizada na análise de resíduos de pesticidas em diferentes áreas. A Cromatografia Gasosa, assim como a Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) são rotineiramente usadas para resolver algumas questões do dia-a-dia e para solucionar diferentes problemas científicos (GÓRECKI *et al.*, 2006).

A Cromatografia vem evoluindo como uma importante ferramenta na separação e identificação de diversos compostos em diferentes amostras. No entanto, apesar do alto poder de separação das técnicas cromatográficas convencionais, algumas amostras são muito complexas para serem analisadas de forma eficaz por estas técnicas. Alguns exemplos importantes de amostras muito complexas incluem amostras petroquímicas, de alimentos, ambientais, fragrâncias e também o setor de química forense. Nestes exemplos de amostras é muito difícil conseguir uma completa separação de todos os componentes presentes na amostra utilizando um simples mecanismo de separação (GÓRECKI *et al.*, 2006; ADAHCHOUR *et al.*, 2006).

A Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*) é uma ferramenta bastante utilizada em análises de resíduos de pesticidas. Isto se deve ao fato desta técnica permitir que a determinação e a confirmação de um grande número de compostos sejam realizadas simultaneamente, em um único instrumento e em uma única análise cromatográfica.

GC-MS tem sido utilizada para determinar resíduos de pesticidas em amostras de frutas e vegetais. Esta técnica é particularmente utilizada na análise de amostras complexas, uma vez que permite eficiente separação e sensibilidade, além de um alto poder de confirmação dos sinais cromatográficos, principalmente para compostos que possuem estruturas diferentes e iguais tempos de retenção (HERNANDEZ *et al.*, 2006).

Além da GC-MS, a Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC×GC, do inglês *Comprehensive two-Dimensional Gas Chromatography*) também fornece vantagens em termos de separação dos analitos de interesse, principalmente quando se utiliza amostras complexas.

2.5.1 Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC×GC)

2.5.1.1 Princípios da técnica GC×GC

Para resolver problemas como a separação do sinal dos analitos do *background* da matriz e melhorar a separação entre os sinais cromatográficos em matrizes complexas, LIU & PHILLIPS (1991) introduziram a técnica de Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC×GC). Esta técnica consiste em duas colunas conectadas em série, onde a segunda coluna recebe toda a porção separada na primeira coluna com análise seqüencial. O efluente da primeira coluna é separado em um grande número de pequenas frações e cada uma dessas frações é separada novamente na segunda coluna. A separação na segunda coluna é muito mais rápida do que na primeira, assim, as frações são estreitas e a separação da primeira coluna pode ser mantida (PHILLIPS & BEENS, 1999).

Dessa maneira, a GC×GC começou a atrair considerável interesse entre químicos analíticos, existindo atualmente, uma considerável quantidade de publicações a respeito deste assunto, as quais discutem fundamentos e conceitos desta tecnologia, além de destacar esta como uma das melhores técnicas de alta resolução para análise de amostras voláteis e semi-voláteis. A GC×GC tem sido aplicada, principalmente, em análises de petróleo e óleos, pesticidas, contaminantes atmosféricos, alimentos, drogas farmacêuticas e polímeros (RYAN & MARRIOT, 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. 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.

Para uma separação cromatográfica ser considerada abrangente, a amostra deve ser submetida a mecanismos independentes de separação; percentagens iguais de todos os componentes da amostra (100% ou menos) devem passar pelas colunas e eventualmente chegar ao detector e a separação obtida na primeira dimensão deve ser mantida (SCHOENMAKERS *et al.*, 2003; GIDDINGS, 1984).

Nos métodos de separação convencionais temos uma linha de retenção, e com a separação bidimensional, temos a separação em um plano com um poder maior para acomodar os picos de uma mistura complexa. A identificação dos componentes é potencialmente mais confiável, pois cada substância tem duas medidas de retenção identificadas, ao invés de apenas uma, como acontece na Cromatografia Gasosa convencional (PHILLIPS & BEENS, 1999).

Uma importante 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 obtido por 1D-GC é dividido em vários segmentos, denominados picos modulados, que são gerados pela separação na segunda coluna, após o processo de modulação, sendo que estes quando agrupados representam o pico primário.

O componente chave do instrumento que permite a injeção de pequenas e estreitas frações da primeira para a segunda coluna é a interface de modulação, localizada entre as duas colunas. A modulação do sinal aplicado permite que um sinal contínuo de um detector no final da segunda dimensão possa ser transformado em um sinal bidimensional (PHILLIPS & BEENS, 1999).

Um esquema de um sistema GC×GC é mostrado na Figura 7. Tipicamente, duas separações cromatográficas baseadas em mecanismos diferentes são usadas, com a interface denominada modulador entre as duas colunas cromatográficas (DALLÜGE *et al.*, 2003).

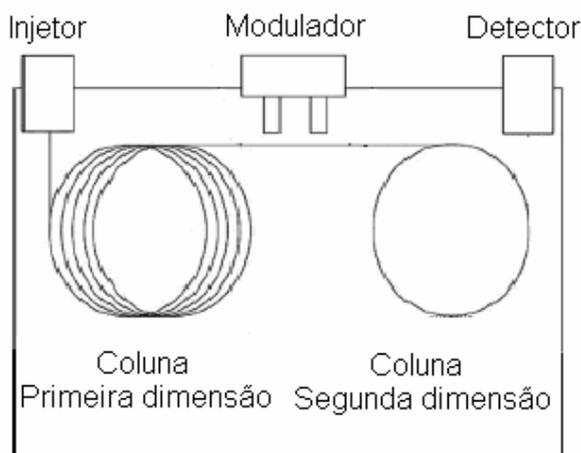


Figura 7 - Esquema de um sistema GCxGC (adaptado de DALLÜGE *et al.*, 2003; ADAHCHOUR *et al.*, 2006)

A forma mais tradicional de separação ortogonal em GCxGC é a utilização de uma coluna apolar, ou de baixa polaridade na primeira dimensão (separação por ponto de ebulição), com dimensões típicas de 25 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme, acoplada a uma coluna mais polar e mais curta na segunda dimensão (separação por polaridade) (MÜHLEN *et al.*, 2007; RYAN & MARRIOT, 2003). A separação subsequente na segunda dimensão é tão rápida, entre 1-10 s, que é realizada sob condições essencialmente isotérmicas, sendo que esta rápida separação resulta em picos com larguras de base tipicamente de 100 a 600 ms (DALLÜGE *et al.*, 2003). Sendo assim, colunas curtas e estreitas são comumente usadas na segunda dimensão, com tamanhos tipicamente de 0,5 a 1,5 m de comprimento, 0,1 a 0,25 mm de diâmetro interno e 0,1 μm de espessura de filme (DALLÜGE *et al.*, 2003; GÓRECKI *et al.*, 2006). Para analitos com igual volatilidade somente a interação com a fase estacionária específica governa a retenção na segunda dimensão. Em alguns sistemas, a segunda coluna é mantida em um forno separado, permitindo uma programação de temperatura mais flexível e independente, enquanto que outros sistemas GCxGC usam somente um forno e, portanto, as condições de temperatura são idênticas para ambas as colunas (DALLÜGE *et al.*, 2003).

A GCxGC 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 mais de 15 anos atrás, tornou-se possível a separação e a identificação de muitos compostos em amostras complexas, além de ocorrer

uma melhora na análise de amostras consideradas menos complexas (ADAHCHOUR *et al.*, 2006; DALLÜGE *et al.*, 2003).

2.5.1.2 Sistema de modulação

O modulador é parte essencial de um sistema GC×GC, por esse motivo, muito esforço tem sido dedicado para o desenvolvimento de um modulador eficiente e robusto, com uma ampla variedade de aplicações. Independente do seu *design*, um modulador deve desempenhar três funções principais: (1) acumular pequenas frações do efluente da primeira coluna enquanto procede normalmente a separação na primeira dimensão, (2) focalizar as frações acumuladas e (3) liberar as frações acumuladas na forma de pulsos estreitos para a segunda dimensão (DALLÜGE *et al.*, 2003).

Os moduladores mais utilizados para executar as separações em GC×GC são os moduladores térmicos (PHILLIPS & BEENS, 1999). Este tipo de modulador garante a conservação de massa, utilizando gradiente de temperatura para acumular e liberar pequenas frações do eluente entre a primeira e a segunda dimensão. Entre os moduladores térmicos está o modulador por varredura térmica, o Sistema Criogênico Longitudinalmente Modulado (LMCS, do inglês *Longitudinally Modulated Cryogenic System*) e moduladores baseados em jatos criogênicos (RYAN & MARRIOT, 2003; HARYNUK & GÓRECKI, 2003).

O primeiro modulador disponível comercialmente foi o modulador por varredura térmica, caracterizado 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. O analito é liberado por meio do aquecimento do capilar, que é resultado do movimento do aquecedor rotativo (DALLÜGE *et al.*, 2003). Este aquecedor rotativo passa ao longo do capilar de filme espesso (tubo modulador) a uma temperatura aproximadamente 100 °C acima da temperatura do forno. A fração acumulada é então transferida para fora do tubo modulador quando as fendas do aquecedor passam ao longo deste tubo, resultando na liberação da fração anteriormente acumulada para dentro da segunda coluna (SHELLIE *et al.*, 2002). Porém,

problemas relacionados à instalação e operação, devido à presença de várias partes móveis limita o uso deste modulador (DALLÜGE *et al.*, 2003).

Mais tarde, surgiu o primeiro sistema criogênico denominado Sistema Criogênico Longitudinalmente Modulado (LMCS), 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 cromatógrafo 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.

Mais recentemente, diferentes versões de jatos criogênicos foram introduzidas. Moduladores semelhantes ao Sistema Criogênico Longitudinalmente Modulado, entretanto, sem a utilização de partes móveis e utilizando um jato mais robusto foram propostos. A Figura 8A mostra um modulador criogênico. Este usa CO₂ líquido ou gás N₂ frio para reter as frações provenientes da primeira coluna. O CO₂ ou N₂ resfria um intervalo da coluna por alguns milisegundos, retornando, em seguida, para a temperatura do forno, liberando assim, as substâncias para a segunda coluna. Em B1 o modulador (jato da direita) retém parte do analito proveniente da primeira coluna. Em B2, o jato da direita é desligado, então este ponto rapidamente aquece e os analitos são liberados e lançados para a separação na segunda coluna. Neste momento, o jato da esquerda é ligado para prevenir que materiais provenientes da primeira coluna interfiram com a fração que já foi focada. Em B3 o jato da direita é novamente ligado e o próximo ciclo de modulação é iniciado (DALLÜGE *et al.*, 2003).

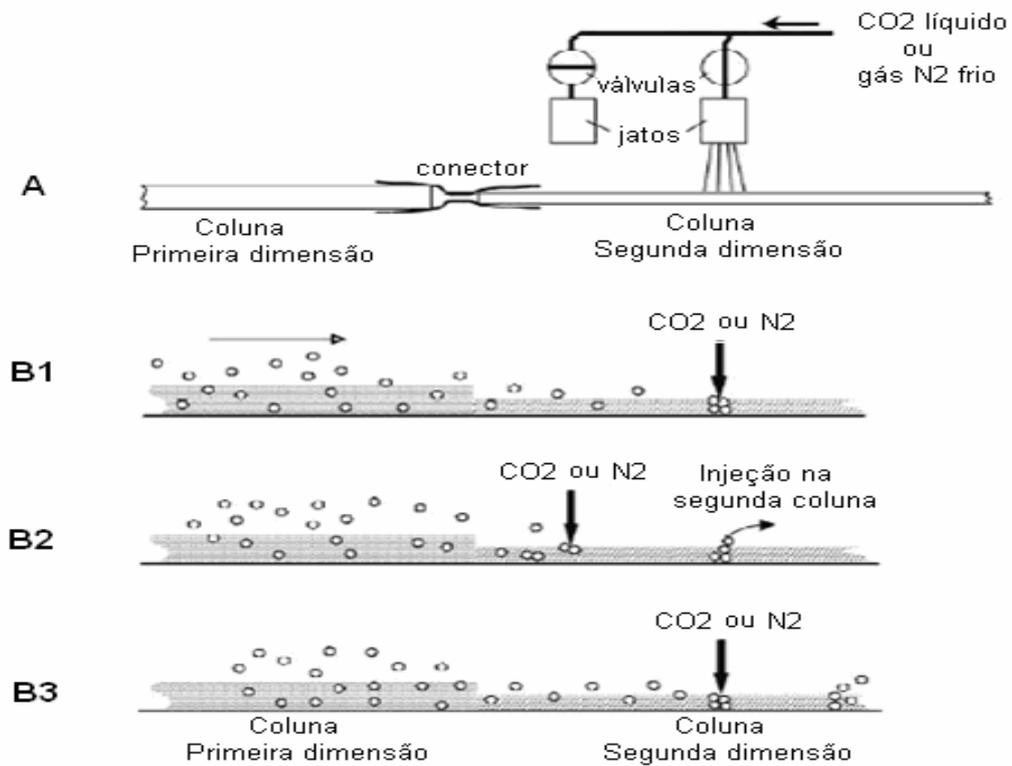


Figura 8 – (A) Esquema de um modulador criogênico com duplo jato de CO₂ líquido ou N₂ gasoso frio, (B1-B3) Funcionamento de um modulador criogênico (adaptado de DALLÜGE *et al.*, 2003)

Os moduladores comumente usados em GC×GC são compostos por duplo jato de CO₂. No entanto, devido ao elevado consumo e custo do CO₂ líquido, e a necessidade de efetuarem-se análises de rotina, é importante o desenvolvimento de um modulador com custo de operação mais baixo. Portanto, visando esta redução de custos, um modulador composto por duplo jato de CO₂ foi aprimorado e modificado para um modulador que utilizasse ar comprimido. A desvantagem deste modulador é a faixa de trabalho, pois o ar comprimido tem uma capacidade limitada de resfriamento sobre a coluna (FRIGGI, 2008).

A Figura 10 demonstra um esquema deste modulador em A e sua representação tridimensional em B.

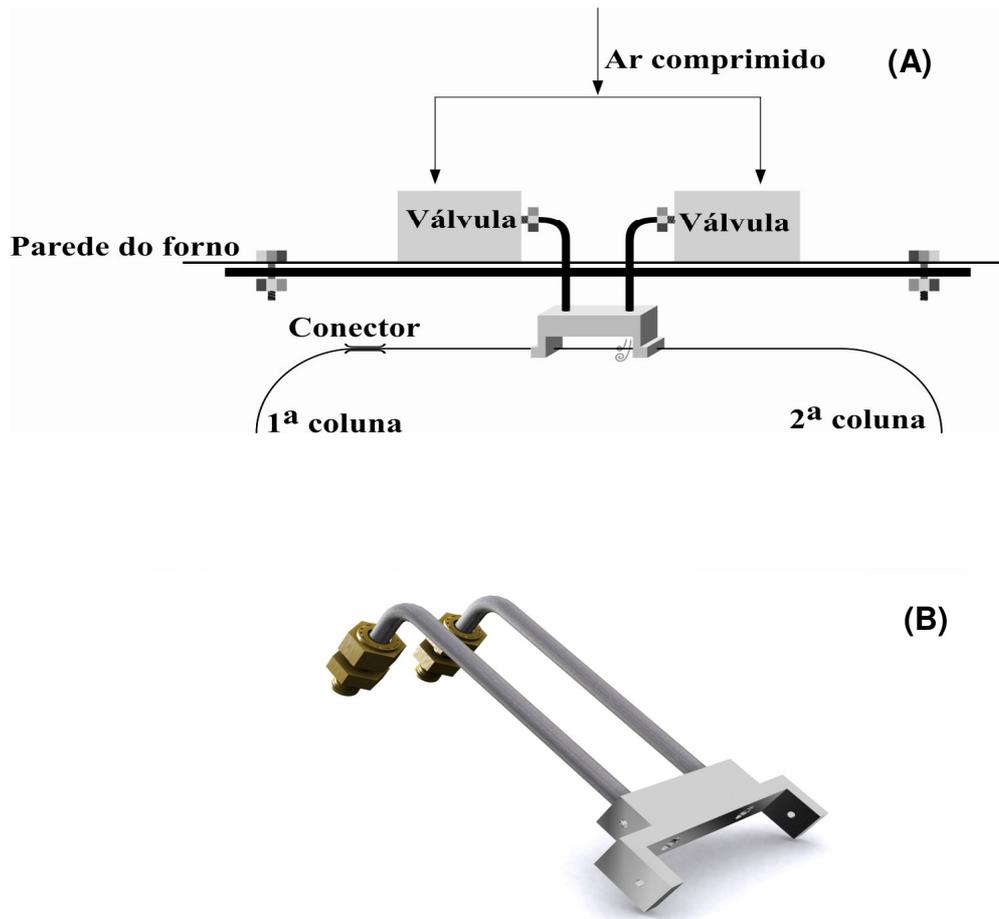


Figura 9 – (A) Esquema do modulador com duplo jato de ar comprimido, (B) representação tridimensional do modulador (FRIGGI, 2008)

2.5.1.3 Detectores

Como descrito anteriormente, a primeira coluna, em geral, é uma coluna com filme espesso de fase estacionária apolar, a qual produz picos relativamente largos e a segunda coluna usada no sistema GC×GC é uma coluna capilar polar. Esse tipo de coluna na segunda dimensão ajuda na obtenção de uma velocidade rápida para maximizar a capacidade do pico e minimizar o tempo total requerido para eluição. Na segunda dimensão, como a eluição produz picos bastante estreitos, são necessários detectores que tenham velocidade de aquisição de dados de pelo menos 100 Hz (ADAHCHOUR *et al.*, 2006; PHILLIPS & BEENS, 1999). Apesar de que muitas das análises em GC×GC sempre foram feitas utilizando Detecção por Ionização em

Chama (FID, do inglês *Flame Ionization Detection*), todos os detectores usados em Cromatografia Gasosa que possuem a característica citada anteriormente podem ser usados para detecção (PHILLIPS & BEENS, 1999).

Atualmente, a micro Detecção por Captura de Elétrons (μ ECD, do inglês *micro-Electron Capture Detection*) tem sido muito usada em GC \times GC, pois além de sua frequência de aquisição de dados (5-50 Hz) ser compatível com o sistema GC \times GC, o seu volume interno de 30 a 150 μ L, pode proporcionar um aumento do sinal (DALLÜGE *et al.*, 2003; KRISTENSSON *et al.*, 2003; KORYTÁR *et al.*, 2005). Por outro lado, o Detector por Captura de Elétrons (ECD) possui um volume interno aproximadamente dez vezes maior e a frequência de aquisição de dados geralmente varia entre 50 e 200 Hz.

Os detectores acima mencionados permitem, sem dúvida, a quantificação dos analitos e são bastante utilizados em GC \times GC, porém, não fornecem informações estruturais dos compostos em estudo. Dessa maneira, o uso de um espectrômetro de massas é indispensável quando se pretende realizar a identificação dos diversos compostos separados (DALLÜGE *et al.*, 2003). O uso da Espectrometria de Massas por Tempo de Voo (TOF-MS, do inglês *Time of Fly Mass Spectrometry*), combinado ao sistema GC \times GC fornece uma das ferramentas de separação e identificação mais poderosas disponíveis em química analítica atualmente. Entretanto, o custo elevado resultante deste acoplamento, restringe o acesso deste instrumento para muitos laboratórios (GÓRECKI *et al.*, 2006).

2.5.1.4 Tipos de diagramas para visualização do sinal analítico

A interpretação dos resultados produzidos em GC \times GC requer um tratamento de dados mais sofisticado do que em 1D-GC em virtude do aumento da complexidade de informação analítica. 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).

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. Em um

diagrama tridimensional, 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.*, 2007).

Na Figura 9 estão demonstradas diferentes representações para o espaço de separação de uma análise realizada por GC×GC para uma amostra de *Eucalyptus dunnii*. Na Figura 9A tem-se o diagrama de contorno, que é um 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.*, 2007).

O diagrama de cores (Figura 9B) é um gráfico bidimensional que representa uma separação bidimensional abrangente, onde as cores representam a intensidade do sinal de detecção. 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). Cada mancha visualizada no diagrama de cores representa a vista superior de um pico cromatográfico em três dimensões (MÜHLEN *et al.*, 2007).

Diagrama de bolhas (Figura 9C) é um gráfico bidimensional que representa uma separação cromatográfica bidimensional abrangente, onde cada pico é representado por um círculo. 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.*, 2007).

Por último, o diagrama de ápices (Figura 9D) é um gráfico bidimensional que representa uma separação cromatográfica bidimensional abrangente, onde os máximos de cada pico são representados por símbolos (SHELLIE *et al.*, 2003).

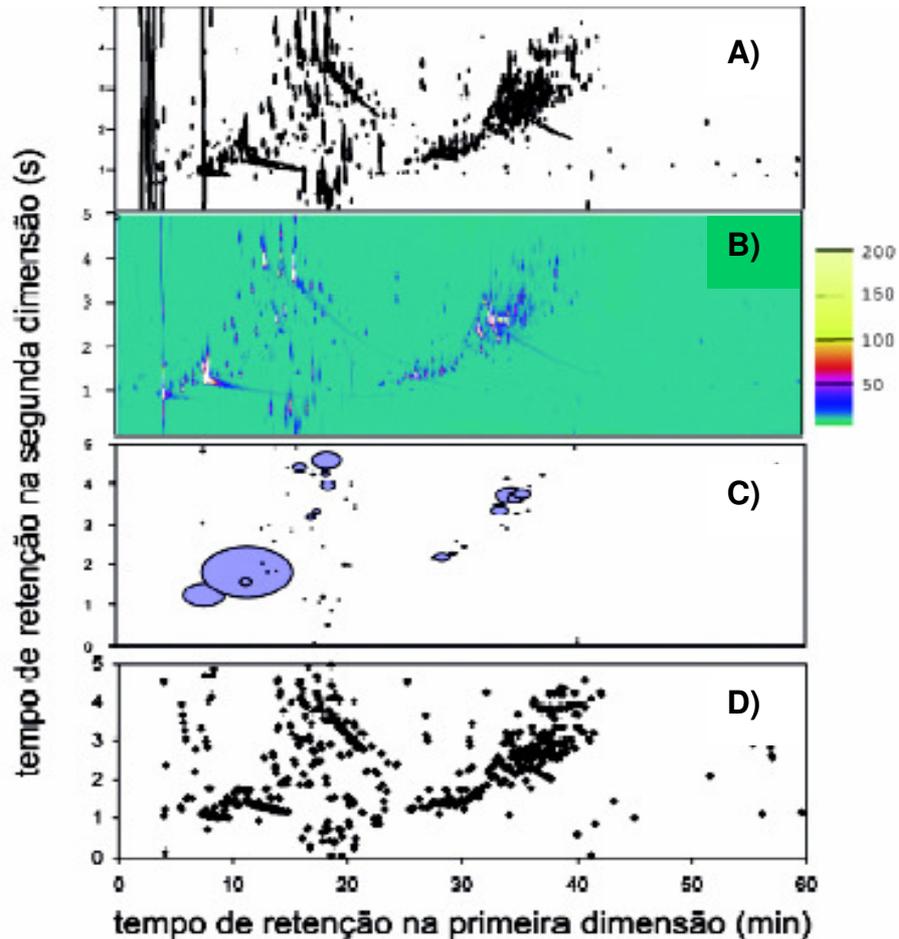


Figura 10 - Representações para o espaço de separação de uma análise realizada por GC×GC para uma amostra de óleo essencial de *Eucalyptus dunnii*, onde: (A) diagrama de contorno, (B) diagrama de cores, (C) diagrama de bolhas e (D) diagrama de ápices (adaptado de MÜHLEN *et al.*, 2007)

2.5.2 Aplicação da GC×GC na análise de resíduos de pesticidas

Beens *et al.* (2001) compararam o desempenho de dois diferentes moduladores utilizando uma mistura de 80 contaminantes, incluindo alguns pesticidas freqüentemente detectados em águas superficiais. Obteve-se boa separação desses analitos, onde todos os picos foram distribuídos praticamente em todo o plano GC×GC, no entanto, não foi realizada análise em amostras reais.

Em 2002, Dallüge *et al.* determinaram 58 pesticidas em extratos de vegetais usando GC×GC-TOFMS. Os autores demonstraram que o uso do sistema GC×GC melhora bastante a separação dos analitos. Todos os analitos de interesse puderam

ser identificados usando GC×GC-TOFMS, o que não foi possível utilizando 1D-GC-TOFMS.

Em 2003, Zrostlíková *et al.* utilizaram GC×GC-TOFMS para a determinação de resíduos de 20 pesticidas em frutas. Os resultados de validação foram bastante satisfatórios, sendo que a grande maioria dos analitos testados puderam ser identificados com confiança em níveis abaixo de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$.

Korytár *et al.* (2005) avaliaram a separação de 12 classes de compostos, incluindo pesticidas organohalogenados, utilizando GC×GC. Neste estudo avaliou-se cinco diferentes combinações de colunas cromatográficas para verificar a separação entre os diferentes grupos estudados. Posteriormente a aplicabilidade da técnica foi demonstrada em extrato de sedimento.

Em 2006, Khummueng *et al.* compararam os resultados obtidos utilizando GC×GC-NPD, GC-NPD e GC×GC- μ ECD na separação e quantificação de uma mistura de nove fungicidas em vegetais. Os resultados de linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão foram satisfatórios. Devido à utilização de GC×GC foi possível observar a decomposição de um dos fungicidas estudados. Além disso, os resultados mostraram que GC×GC-NPD gerou picos mais estreitos que os gerados utilizando o método convencional GC-NPD, no entanto, a soma das áreas dos picos obtidos por GC×GC-NPD foi similar às áreas obtidas por GC-NPD para cada um dos pesticidas estudados.

Em 2008, Banerjee *et al.* otimizaram o método GC×GC-TOFMS para análise de resíduos de pesticidas. A técnica otimizada resolveu problemas de co-eluição, os quais eram observados em 1D-GC-MS e permitiu a separação cromatográfica de 51 pesticidas em 24 minutos. Os valores de LOD melhoraram de 2 a 12 vezes utilizando GC×GC-TOFMS em comparação a GC-TOFMS, devido aos picos mais altos e mais estreitos obtidos em GC×GC. O método foi testado para amostras de uva, onde os resultados de recuperação ficaram dentro da faixa de 70 a 110% no nível de fortificação de 10 ng g^{-1} .

Cochran (2008) utilizou o sistema GC×GC-TOFMS para analisar pesticidas em extrato de tabaco, percebendo que esta é uma excelente técnica para análise de resíduos de pesticidas, pois resultou em valores de exatidão e sensibilidade adequados. No entanto, neste trabalho, maior ênfase foi dada para análise qualitativa da amostra.

Schurek *et al.* (2008) desenvolveram um novo método para detectar 36 pesticidas em amostras de chás baseado na hifenização HS-SPME–GC×GC-TOFMS. A repetitividade das medidas, expressa em desvio padrão relativo (RSD) foi menor que 24% e os valores de LOQ variaram de 1 a 28 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O método foi em seguida aplicado a amostras reais de chá.

2.6 Validação de métodos cromatográficos

Em geral, a validação de um método envolve a execução e a interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de avaliar as características do método. Desta forma, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, tais como: procedimento de amostragem, preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e avaliação dos dados (LANÇAS, 2004).

A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). A validação é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo seu desenvolvimento (RIBANI *et al.*, 2004).

Se um método existente for modificado para atender aos requisitos específicos, ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve assegurar que as características de desempenho do método atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas. O processo de validação de um método deve estar descrito em um procedimento, e os estudos para determinar os parâmetros de desempenho devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e adequadamente calibrados. Do mesmo modo, o operador que realiza os estudos deve ser competente na área de estudo e precisa ter conhecimento suficiente sobre o trabalho, sendo capaz de tomar as decisões apropriadas durante a realização do estudo (INMETRO, 2003).

É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados. Um método para a determinação de um composto majoritário requer um

critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traços. A frequência com que o método será utilizado (muitas vezes em um dia, uma vez em um dia para um estudo rápido, uma vez em um mês, etc.) também influencia o tipo de estudo de validação que é necessário. Portanto, os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método (RIBANI *et al.*, 2004).

Os parâmetros para validação de métodos vêm sendo definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais. Considerando as inúmeras áreas que necessitam gerar dados confiáveis, é consenso que os conceitos e definições dos parâmetros de validação não estão completa e rigidamente estabelecidos, mas continuam a evoluir e aprimorarem-se, no sentido de se efetuar a validação do método de maneira que atenda os objetivos e necessidades para os quais o método é proposto (LANÇAS, 2004). Neste trabalho, os parâmetros utilizados foram avaliados seguindo as orientações estabelecidas pelo INMETRO: curva analítica e linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão.

Atualmente, admite-se que as soluções analíticas dos pesticidas devem ser preparadas em extrato da matriz ao invés de serem preparadas em solventes puros, a menos que se prove 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).

2.6.1 Curva analítica e linearidade

A melhor forma de realizar quantificações em cromatografia é baseada numa curva analítica, onde se determina as áreas cromatográficas, estabelecendo as quantidades de analitos nas amostras analisadas. A curva analítica é, portanto, a relação entre sinais – no caso as áreas – e quantidades do analito a ser quantificado (AUGUSTO *et al.*, 2003).

Dentro da faixa linear de trabalho há uma relação linear entre a resposta do sinal (detector) e o valor (concentração) do composto em estudo (INMETRO, 2003). A equação de regressão linear (Equação (1)) que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b \quad (1)$$

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 o coeficiente de correlação linear (r), o qual é freqüentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático, fornecendo, portanto, uma estimativa da qualidade da curva analítica obtida. A curva analítica deve ter alto coeficiente de correlação, ou seja, $r > 0,99$ (ANVISA, 2003) ou $r > 0,9$ (INMETRO, 2003) ou coeficiente de determinação, $r^2 > 0,999$ (PIMENTEL & NETO, 1996), o que evidencia um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão.

A linearidade de um método analítico pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito, sendo definida como sendo a capacidade deste método em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma determinada faixa de concentração (INMETRO, 2003). Na prática, a linearidade é determinada através das curvas analíticas. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes (INMETRO, 2003; BRASIL, 2003).

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

Quando são realizadas medidas em amostras com baixas concentrações do analito, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2003).

O limite de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente, quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, nas condições experimentais estabelecidas. Estes limites são

estabelecidos por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito e são geralmente expressos em unidades de concentração (BRASIL, 2003).

2.6.3 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). As duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e precisão intermediária, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão (s) ou desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*). A precisão é dependente da concentração do analito, devendo, portanto, ser determinada para diferentes concentrações (INMETRO, 2003).

A repetitividade é representada pelo grau de concordância dos resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade, como por exemplo: mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo (INMETRO, 2003).

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre uma mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, definindo exatamente quais condições a variar, tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes tempos. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável para ser usada (INMETRO, 2003). Recomenda-se, para o cálculo da precisão intermediária, um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003).

Em métodos de análise de traços são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (GARP, 1999).

2.6.4 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, sendo este último, um dos critérios mais importantes para o julgamento do desempenho de um método analítico (INMETRO, 2003). A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão. Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (RIBANI *et al.*, 2004).

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2003). Na análise de compostos orgânicos, a exatidão é avaliada por processos de recuperação, uma vez que, normalmente, não existem materiais de referência certificados.

A recuperação dos analitos pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas deste. As amostras devem ser fortificadas com os analitos em pelo menos três diferentes concentrações. A limitação desse procedimento é que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que se apresenta na amostra (INMETRO, 2003).

A recuperação geralmente é dependente da concentração, por isso deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para as amostras. 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).

2.6.5 Efeito matriz

O efeito matriz é observado quando uma diferença de resposta é obtida entre padrões preparados no solvente e padrões preparados no extrato da matriz. Uma das maneiras de minimizar e/ou eliminar este efeito é reduzir a quantidade de

componentes da matriz que coeluem com os analitos no detector, para isto, métodos de extração mais seletivos e etapas mais eficientes de *clean-up* devem ser desenvolvidos (PICÓ *et al.*, 2004). O efeito matriz pode facilmente tornar-se maior, em baixas concentrações do analito, pois há um decréscimo na razão de concentração do analito/concentração da matriz.

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 (PRESTES, 2007).

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 (ZROSTLIKOVA & HAJŠLOVÁ, 2003).

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios do *Analytical Chemistry & Applied Sciences (ACAS)* da *Free University*, Amsterdã, Holanda, com apoio do laboratório *Food and Consumer Product Safety Authority (VWA)*, Amsterdã, Holanda.

O desenvolvimento experimental consistiu na comparação do desempenho de dois diferentes métodos de extração, modificações dos métodos QuEChERS e mini-Luke, para extração de pesticidas piretróides fortificados em amostras de tomate, sendo em seguida, submetidas à análise por GC×GC-μECD. Estes procedimentos de extração foram comparados, principalmente, em termos de LOD, LOQ, linearidade, repetitividade, precisão intermediária, efeito matriz e resultados de recuperação (exatidão).

A análise cromatográfica foi realizada por cromatografia gasosa bidimensional abrangente, onde foi avaliado um modulador utilizando ar comprimido, o qual foi aprimorado no laboratório da *Free University*, Amsterdã, Holanda.

3.1 Reagentes e solventes

- Acetato de etila, grau pesticida (Lab-scan Analytical Science, Irlanda);
- Diclorometano, éter de petróleo, acetona, acetonitrila, ácido acético, acetato de sódio anidro, sulfato de sódio anidro, sulfato de magnésio anidro, todos grau pesticida (Merck, Alemanha);
- Sorvente PSA (Varian, USA)
- Padrões sólidos dos pesticidas (fornecedores conforme Tabela 5).
- Branco do extrato (tomate), previamente analisado no laboratório *Food and Consumer Product Safety Authority*, confirmando a ausência dos pesticidas em estudo.

3.2 Materiais

- Pipetador *Hand Step*[®] (Brand, Alemanha);
- Dispensador Optifix, capacidade 50 mL (GS, Alemanha);

- Seringas de volumes de 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 μL (Hamilton, Suíça);
- Tubos de politetrafluoretileno (PTFE) com tampa rosqueável, capacidade de 250 mL fabricado sob medida (Holanda);
- Tubos de polipropileno, com tampa rosqueável, capacidade de 15 e 50 mL (BD Labware, França);
- Vidrarias comuns de laboratório.

3.3 Pesticidas selecionados

Os pesticidas piretróides selecionados para este estudo estão listados na Tabela 5, com seu fornecedor, grau de pureza, fórmula molecular e classificação toxicológica. As estruturas químicas destes compostos estão demonstradas no item 2.2.3.

Tabela 5 - Pesticidas analisados por GC×GC- μECD

Pesticida	Fornecedores	Grau de pureza	Fórmula molecular	Classificação Toxicológica*
Bifentrina	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	98,0	$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{ClF}_3\text{O}_2$	II
Ciflutrina	Riedel-de Haën (Alemanha)	98,0	$\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{FNO}_3$	II
Esfenvalerato	Riedel-de Haën (Alemanha)	99,9	$\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{ClNO}_3$	II
Fenpropatrina	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	99,0	$\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_3$	II
Fenvalerato	Riedel-de Haën (Alemanha)	99,8	$\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{ClNO}_3$	III
Permetrina <i>cis</i>	Zeneca (Estados Unidos)	99,4	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{O}_3$	III
Permetrina <i>trans</i>	Zeneca (Estados Unidos)	96,4	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{O}_3$	III

* conforme descrita no item 2.1

3.4 Instrumentação

3.4.1 Instrumentação geral

- Sistema de purificação de água Milli-Q® - resistividade 18,2 MΩ cm (MilliPore®, EUA);
- Balança analítica 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 ultra-som M3510 DHT (Branson, México);
- Banho de água MP Basis (Julabo, Alemanha);
- Homogeneizador Ultraturrax PT 6000 (Polytron, Suíça);
- Centrífuga Falcon 6/300, refrigerada (MSE, Inglaterra).
- Centrífuga Harrier 18/80, refrigerada (MSE, Inglaterra);
- Evaporador RapidVap (Labconco, EUA);

3.4.2 Sistema cromatográfico GC×GC-μECD

Cromatógrafo a gás HP 6890 GC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) composto por:

- ✓ Amostrador automático série HP 7673;
- ✓ Injetor *split/splitless*, com insensor de vidro silanizado, d.i. 4 mm;
- ✓ Modulador com duplo jato de ar comprimido (desenvolvido no laboratório da *Free University*, Amsterdã, Holanda);
- ✓ 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 μm de espessura de filme (Varian, Holanda);
- ✓ 2ª coluna capilar VB-50 (50% metilpolisiloxano e 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);
- ✓ Micro Detector por Captura de Elétrons (μECD) com volume de célula de 150 μL (Agilent Technologies);

- ✓ Sistema de aquisição de dados HP *Chemstation* A.07.01 (Agilent) para integração dos picos; *2D Converter Program* beta version 1.0 (Gerard Sharp) para converter os dados para 2 dimensões e *software Transform* version 3.4 (Fortner software) para interpolar a imagem dos dados.

3.5 Gases utilizados

- Gás de arraste: Hélio 99,9999% de pureza (Praxair, Holanda);
- Gás *make up* do detector μ ECD: Nitrogênio 99,999% de pureza (Praxair, Holanda);
- Ar comprimido, obtido com compressor industrial.

3.6 Otimização do sistema GC×GC- μ ECD para determinação dos resíduos de pesticidas

Em procedimentos analíticos onde se empregam técnicas cromatográficas, tal como a Cromatografia a Gás, deve-se seguir alguns parâmetros importantes a fim de se obter maior eficiência, sensibilidade e seletividade na separação dos compostos.

3.6.1 Coluna cromatográfica e programação de temperatura do forno da coluna

Para a separação por GC×GC dos pesticidas piretróides bifentrina, ciflutrina, esfenvalerato, fenpropratrina, fenvalerato, permetrina *cis* e permetrina *trans* foi empregada na primeira dimensão uma coluna capilar VF-5 e na segunda dimensão uma coluna capilar VB-50, as quais foram submetidas a três diferentes rampas de aquecimento do forno da coluna para se escolher a mais adequada. Estas programações estão demonstradas na Tabela 6. Para estes testes foi utilizada uma

solução analítica contendo 1,0 mg L⁻¹ de cada pesticida e vazão do gás de arraste constante em 1 mL min⁻¹.

Tabela 6 - Programas (P) de temperatura do forno da coluna utilizados na escolha dos parâmetros da separação cromatográfica

Programa	Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C min ⁻¹)	Tempo total (min)
P1*	Inicial	100	3	49,0
	Final	300		
P2*	Inicial	50	10	67,0
	Intermediária	200	3	
	Final	300		
P3*	Inicial	80	20	25,0
	Intermediária	200	5	
	Final	300		

*vazão constante

3.6.2 Estudo da melhor vazão do gás de arraste

Para selecionar a melhor vazão do gás de arraste a ser empregada na separação cromatográfica dos compostos em estudo, injetou-se 1 µL da solução contendo 1,0 mg L⁻¹ da mistura dos pesticidas em estudo. Utilizando-se o programa de temperatura que proporcionou melhores resultados (P3*), foram testadas três diferentes vazões: 0,8; 1,0 e 1,2 mL min⁻¹.

3.6.3 Sistema de injeção e de detecção

Foi utilizada a temperatura de 280 °C para o injetor e 300 °C para o detector µECD. Para o detector, utilizou-se N₂ como gás *make-up*, testando três diferentes vazões: 60; 100 e 120 mL min⁻¹.

A injeção foi efetuada com um injetor automático, utilizando um volume de injeção de 1 µL no modo *splitless*.

3.7 Preparo das soluções analíticas

Para o preparo da solução analítica estoque (1000 mg L^{-1}), os padrões sólidos foram pesados individualmente e transferidos para balão volumétrico com capacidade de 20 mL, sendo em seguida, dissolvidos em tolueno, e homogeneizados por 5 minutos em banho de ultra-som.

Em seguida, preparou-se 10 mL de uma mistura de concentração 100 mg L^{-1} contendo todos os pesticidas a serem estudados. Essa mistura foi preparada em acetato de etila e 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 uma solução de concentração 10 mg L^{-1} em acetato de etila, que também foi armazenada em frasco âmbar (tampa contendo batoque de PTFE), com capacidade de 20 mL.

Todas as soluções analíticas foram preparadas tanto em solvente orgânico (acetato de etila) como no extrato da matriz (tomate). Dessa maneira, pôde-se avaliar o efeito da matriz durante as análises, comparando os resultados obtidos para ambos os métodos.

As soluções 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.

3.7.1 Método QuEChERS modificado

A mistura intermediária de 10 mg L^{-1} foi utilizada para preparar as soluções analíticas para o estudo de linearidade e confecção das curvas analíticas, através de sua diluição, nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ para o estudo do método QuEChERS modificado. A estabilidade destas soluções é de cerca de 3 meses (AVRAMIDES, 2005).

A mistura de concentração 10 mg L^{-1} também foi utilizada para os ensaios de fortificação. No caso da modificação do método QuEChERS utilizou-se 20, 50 e 200 μL desta solução para obter os níveis de fortificação de 20, 50 e $200 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

3.7.2 Método mini-Luke modificado

Para o estudo do método mini-Luke, partiu-se de uma mistura de concentração 10 mg L^{-1} , preparou-se as soluções analíticas para o estudo de linearidade e confeccionaram-se as curvas analíticas nas concentrações 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, com estabilidade de cerca de 3 meses (AVRAMIDES, 2005). Para os ensaios de fortificação, utilizou-se 50, 200 e 500 μL , correspondentes aos níveis de fortificação de 50, 200 e 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

3.8 Ensaios de fortificação e extração

Tendo em vista que este trabalho consistiu na comparação de dois diferentes métodos de extração (métodos QuEChERS e mini-Luke modificados) para determinação de pesticidas piretróides fortificados em tomate utilizando GC \times GC- μECD , algumas etapas do procedimento foram alteradas para que esta comparação fosse possível.

Um aspecto importante foi a introdução de uma etapa de *clean-up* utilizando o sorvente PSA (amina primária secundária) em ambos os métodos, salientando que a mesma proporção de PSA foi adicionada tanto no método QuEChERS quanto no mini-Luke. Outro aspecto importante diz respeito ao solvente final que compõe a matriz, sendo que, em ambos os métodos, o solvente final foi acetato de etila, além de manter para ambos os métodos a mesma relação entre a quantidade de amostra e o volume de extrato final, facilitando, dessa maneira, a comparação entre os resultados.

O tomate utilizado para este estudo foi previamente analisado no laboratório *Food and Consumer Product Safety Authority (VWA)*, confirmando a ausência dos pesticidas, sendo então utilizado como tomate “branco” para avaliação dos métodos estudados.

Os níveis de fortificação de ambos os métodos foram escolhidos baseados no limite de quantificação destes, onde o primeiro nível corresponde a 1 LOQ e o último corresponde a 10 LOQ do respectivo método de extração, o nível restante corresponde a um valor intermediário a estes valores.

3.8.1 Método QuEChERS modificado

O tomate foi previamente homogeneizado e em seguida, pesou-se porções de $10,0 \pm 0,1$ g diretamente em tubos de polipropileno (capacidade de 50 mL) com tampa rosqueável. Logo após, efetuou-se a fortificação aos níveis de 20, 50 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, utilizando-se seringas Hamilton[®], adicionando-se, respectivamente, 20, 50 e 200 μL de uma solução analítica 10 mg L^{-1} , contendo os pesticidas em estudo.

Adicionou-se, através de pipetador *Hand Step*[®], 10 mL de acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético, em cada tubo, e após fechá-los efetuou-se agitação manual e vigorosa por cerca de 1 minuto. Em seguida, acrescentou-se 2,0 g de sulfato de magnésio anidro e 2,0 g de acetato de sódio anidro, cuidando para que estes sólidos não ficassem nas bordas superiores dos tubos, prejudicando o contato com o líquido. Agitou-se novamente manual e vigorosamente durante 1 minuto para garantir a completa interação entre o extrato líquido e os reagentes sólidos. Em seguida, os tubos tampados foram levados para centrifugação a 4000 rpm, durante 4 minutos. Posteriormente, separou-se a parte sólida e líquida e acrescentou-se mais 2,0 g de sulfato de magnésio anidro, repetindo-se a agitação e centrifugação descritas anteriormente. Em seguida, transferiu-se 4 mL do extrato líquido para outro tubo de polipropileno com capacidade de 15 mL, já contendo uma mistura de 600 mg de sulfato de magnésio anidro e 500 mg de PSA, sendo novamente agitados vigorosa e manualmente por cerca de 45 segundos, e também centrifugados como citado anteriormente. A última etapa consistiu em retirar 2 mL desse extrato e transferir para frasco de vidro com capacidade de 10 mL e evaporar até total secura do solvente acetonitrila utilizando evaporador RapidVap, sendo então reconstituído em 2 mL de acetato de etila e posteriormente analisado por GC×GC- μ ECD.

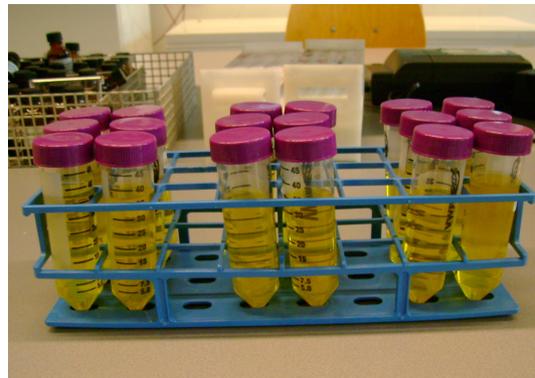
Na Figura 11 tem-se a visualização de alguns equipamentos e materiais utilizados para a realização do processo de extração pelo método QuEChERS, o qual está esquematizado na Figura 12.



(A)



(B)



(C)

Figura 11 - Alguns equipamentos e materiais utilizados no método QuEChERS: (A) evaporador RapidVap, (B) centrífuga e (C) extrato da matriz em tubos de polipropileno com capacidade de 50 mL

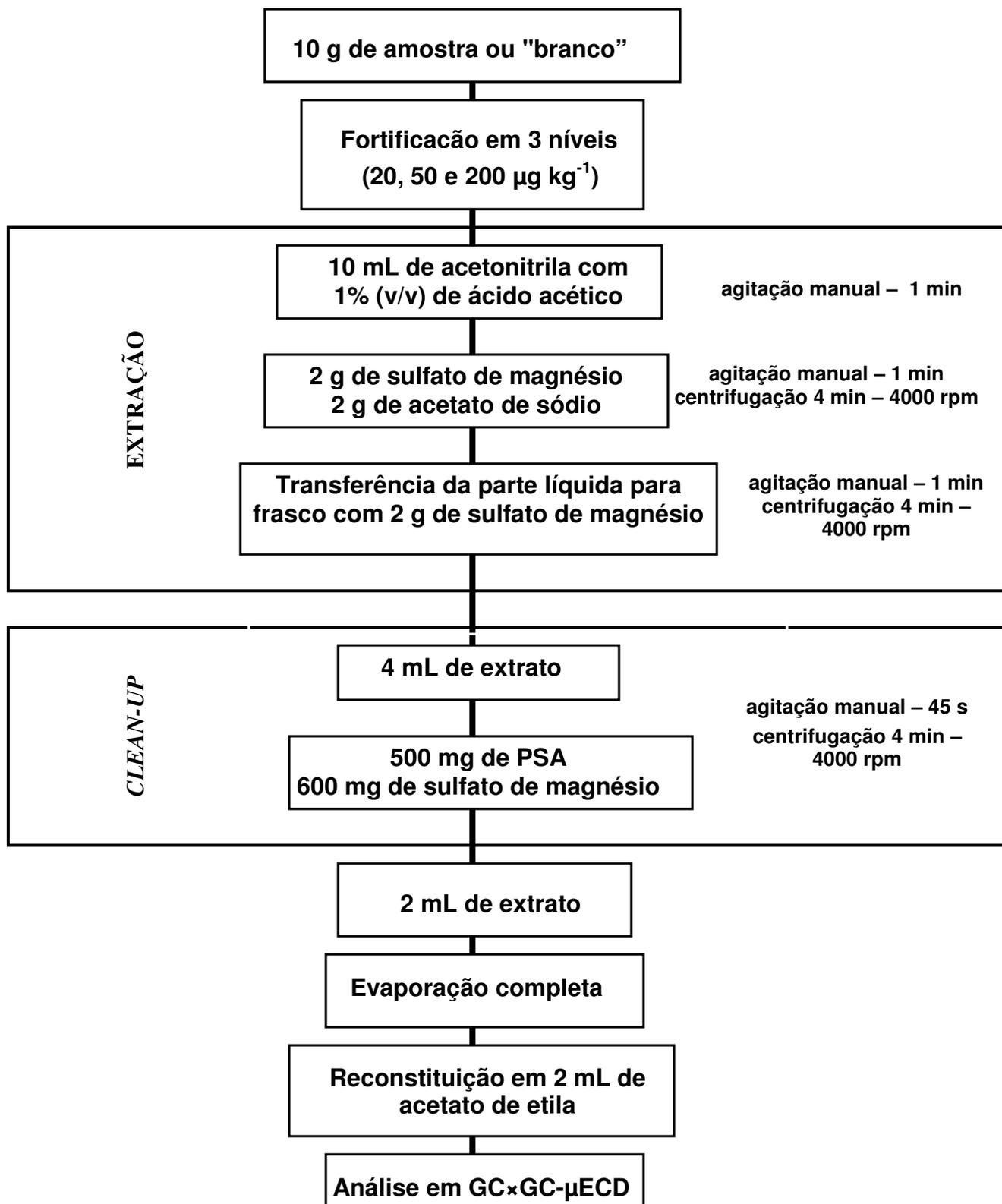


Figura 12 – Esquema do método de extração QuEChERS modificado para análise de resíduos de pesticidas em tomate

3.8.2 Método mini-Luke modificado

No método mini-Luke modificado, o tomate foi previamente homogeneizado e em seguida, pesou-se porções de $10,0 \pm 0,1$ g de tomate diretamente dentro dos tubos de PTFE com tampa rosqueável. A fortificação foi realizada utilizando-se seringas de injeção Hamilton[®]. Para fortificação aos níveis de 50, 200 e 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ adicionou-se, respectivamente, 50, 200 e 500 μL , de uma solução analítica na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, contendo os pesticidas a serem analisados.

Após a fortificação, as amostras foram levadas para extração, adicionando-se inicialmente 30 mL de acetona, sendo a mistura levada ao homogeneizador Ultraturrax por cerca de 30 segundos, a 15.000 rpm. Em seguida, adicionou-se 60 mL da mistura dos solventes éter de petróleo e diclorometano (1:1 v/v), além de $10,0 \pm 0,1$ g de sulfato de sódio anidro, sendo novamente levado ao homogeneizador nas condições descritas anteriormente. Os tubos foram então levados para centrifugação a 3600 rpm, durante 3 minutos e, em seguida, o líquido foi transferido para erlenmeyer com tampa. Uma alíquota de 12 mL foi transferida para tubo de polipropileno com tampa rosqueável contendo 1,5 g de PSA, realizando agitação manual por 1 minuto. Os tubos foram novamente submetidos à etapa de centrifugação.

Um volume de 9 mL dos extratos obtidos foi transferido para tubos graduados de 10 mL, e colocados em banho de água já aquecida a $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo que em seguida, esta temperatura foi aumentada até atingir $62 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Os tubos foram retirados do banho alguns minutos antes de completa secura e deixados em temperatura ambiente até secura total. O extrato foi reconstituído com 1 mL de acetato de etila.

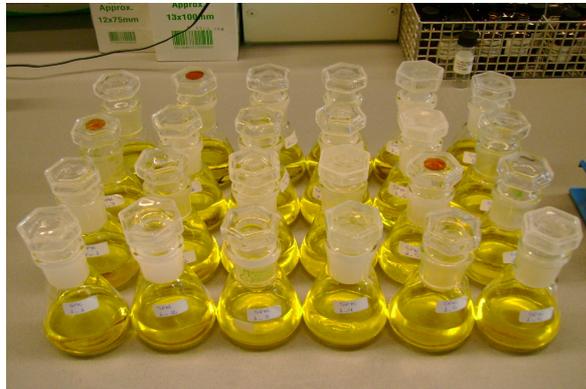
Na Figura 13 estão demonstrados alguns equipamentos e materiais utilizados para a realização do processo de extração pelo método mini-Luke. A descrição desse procedimento de forma esquemática é demonstrada no fluxograma da Figura 14.



(A)



(B)



(C)

Figura 13 - Alguns equipamentos e materiais utilizados no método mini-Luke: (A) banho de água para evaporação do solvente, (B) centrífuga e (C) extrato da matriz em erlenmeyer com tampa

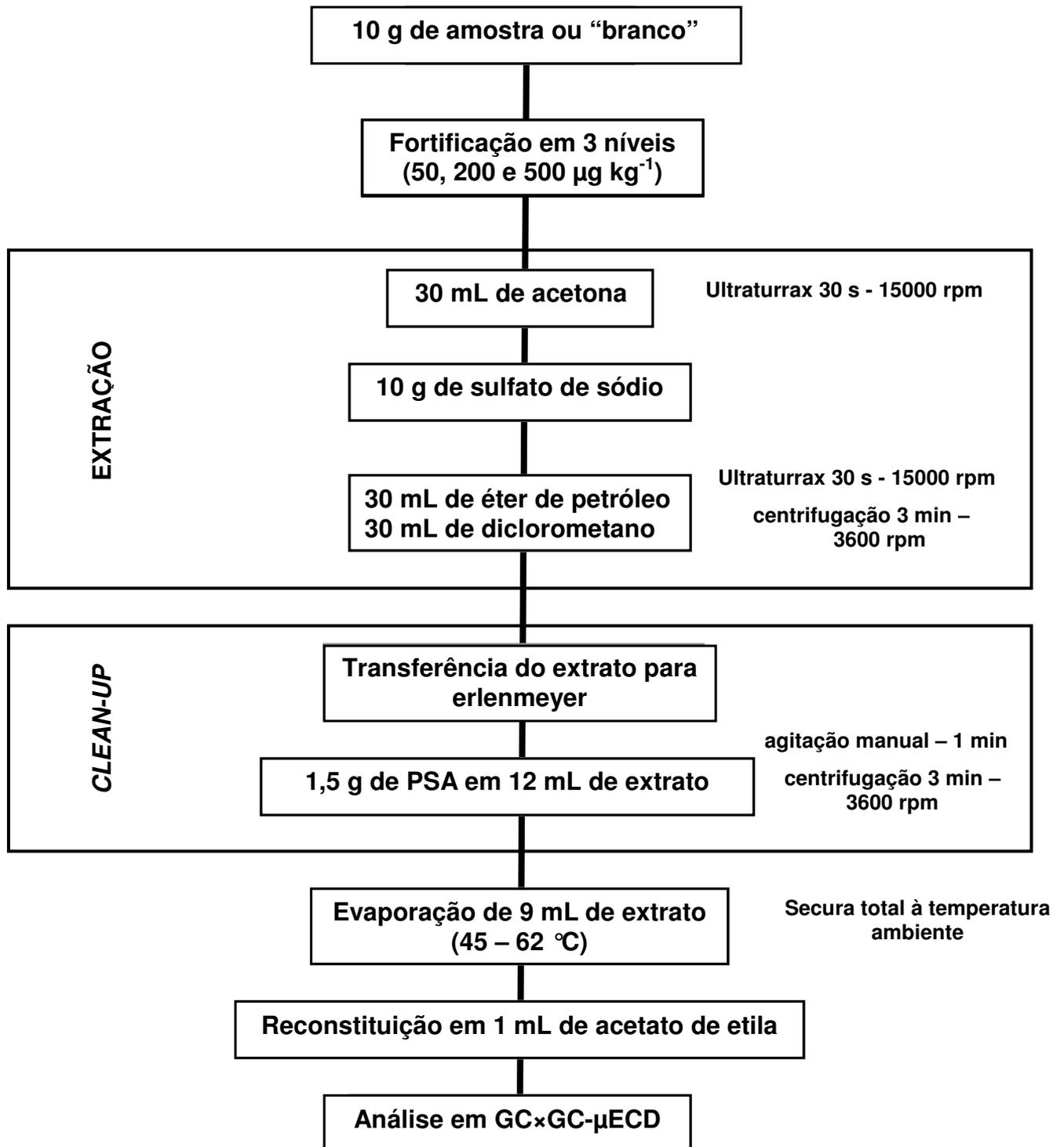


Figura 14 - Esquema do método de extração mini-Luke modificado para análise de resíduos de pesticidas em tomate

3.9 Análise dos solventes e reagentes

A análise dos solventes e reagentes tem a finalidade de verificar a pureza dos solventes e reagentes utilizados com relação à contaminação com os resíduos dos pesticidas estudados. Este procedimento consiste em realizar todo o procedimento normal de extração das amostras, porém sem o extrato da matriz (tomate), conseqüentemente, sem a fortificação da mesma.

3.9.1 Método QuEChERS modificado

Adicionou-se, através de pipetador *Hand Step*[®], 10 mL de acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético em cada tubo de polipropileno com tampa rosqueável (capacidade de 50 mL), e após fechá-los efetuou-se agitação manual e vigorosa por cerca de 1 minuto.

Em seguida, acrescentou-se 2,0 g de sulfato de magnésio anidro e 2,0 g de acetato de sódio anidro. Repetiu-se a agitação manual por cerca de 1 minuto, assegurando-se da completa interação entre o solvente e os reagentes sólidos. Os tubos tampados foram levados para centrifugação a 4000 rpm, por 4 minutos. Em seguida, separou-se a parte líquida e acrescentou-se mais 2,0 g de sulfato de magnésio anidro, repetindo-se a agitação e centrifugação descritas anteriormente.

Posteriormente, realizou-se a etapa de *clean-up* do extrato, onde transferiu-se 4 mL do extrato líquido para outro tubo de polipropileno (capacidade de 15 mL), já contendo 600 mg de sulfato de magnésio anidro e 500 mg de PSA, sendo novamente agitados vigorosa e manualmente por cerca de 45 segundos e centrifugados como descrito anteriormente.

A última etapa consistiu em retirar 2 mL de extrato e transferir para frasco de vidro, e então evaporar até total *secura* do solvente utilizando evaporador RapidVap. Em seguida foi reconstituído em 2 mL de acetato de etila, sendo posteriormente analisado por GC×GC-μECD. Esta mistura é chamada de “branco” do solvente, por não conter o extrato da matriz e os pesticidas em estudo.

3.9.2 Método mini-Luke modificado

Adicionou-se através de dispensador 30 mL de acetona dentro de tubo de PTFE com tampa rosqueável já contendo 10 g de sulfato de sódio anidro, sendo, em seguida, levado ao homogeneizador Ultraturrax por cerca de 30 segundos, a 15.000 rpm. Posteriormente, adicionou-se 60 mL da mistura dos solventes éter de petróleo e diclorometano (1:1 v/v), sendo novamente levado ao homogeneizador nas mesmas condições anteriores.

O tubo foi levado para centrifugação a 3600 rpm, durante 3 minutos. O líquido foi transferido para erlenmeyer com tampa e, posteriormente, transferiu-se 12 mL desse conteúdo para tubo de polipropileno com tampa rosqueável contendo 1,5 g de PSA, realizando-se agitação manual vigorosa por cerca de 1 minuto. Os tubos foram novamente submetidos à etapa de centrifugação.

Uma alíquota de 9 mL foi transferida para tubo graduado com capacidade de 10 mL e colocado em banho de água aquecida. O solvente é evaporado até completa secura e reconstituído em 1 mL de acetato de etila, sendo posteriormente analisado por GC×GC-μECD. Esta mistura é chamada de “branco” do solvente.

3.10 Validação dos métodos de extração QuEChERS e mini-Luke modificados para análise de resíduos de pesticidas piretróides em tomate

Definidas as melhores condições para a separação dos pesticidas em GC×GC-μECD e melhores condições com relação aos métodos de extração, foi realizada a validação dos métodos. A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). A validação é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo seu desenvolvimento (RIBANI *et al.*, 2004).

Esse trabalho foi validado seguindo principalmente os procedimentos recomendados no Brasil para validação de métodos (INMETRO, 2003; BRASIL, 2003) e envolvem os parâmetros descritos a seguir.

3.10.1 Determinação da linearidade das curvas analíticas

Avaliou-se a linearidade das curvas analíticas tanto em solvente, quanto no extrato da matriz (tomate), obtida para os dois métodos, sendo que a curva analítica para os pesticidas selecionados foi construída na faixa de concentração de 0,01 a 1,0 mg L⁻¹ no caso do método QuEChERS modificado, e na faixa de concentração de 0,02 a 1,0 mg L⁻¹ no caso do método mini-Luke modificado. Todas as soluções foram preparadas em acetato de etila e também no extrato da matriz.

A seqüência de injeção consistiu primeiramente na injeção do branco dos reagentes e em seguida injetou-se 6 vezes a seqüência das soluções analíticas (cada seqüência foi injetada da menor concentração para a maior e entre cada seqüência injetou-se o branco dos reagentes). O mesmo foi feito no caso da injeção da curva no extrato da matriz, ou seja, inicialmente injetou-se o branco do extrato e, em seguida, 6 vezes a seqüência das soluções analíticas da menor para a maior concentração, e entre cada seqüência injetou-se o branco do extrato. O gráfico da área dos respectivos picos x concentração, a equação da reta e o coeficiente de determinação (r^2) foram obtidos com auxílio do programa Microsoft Office® Excel 2003.

3.10.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Neste trabalho, o LOD corresponde à concentração que produz uma relação sinal-ruído igual a 3 e o LOQ uma relação igual a 10 (Figura 15). Para isso, mediu-se a altura do ruído próximo ao tempo de retenção dos compostos e determinou-se a concentração que corresponde a 3 e 10 vezes essa altura.

No caso do método QuEChERS modificado utilizou-se uma solução analítica de concentração 0,02 mg L⁻¹ e no método mini-Luke modificado, uma solução padrão de concentração 0,05 mg L⁻¹, que representam concentrações onde a integração dos picos de todos os pesticidas pôde ser realizada com segurança. Este procedimento foi realizado com padrões preparados tanto no solvente acetato de etila, quanto no extrato da matriz.

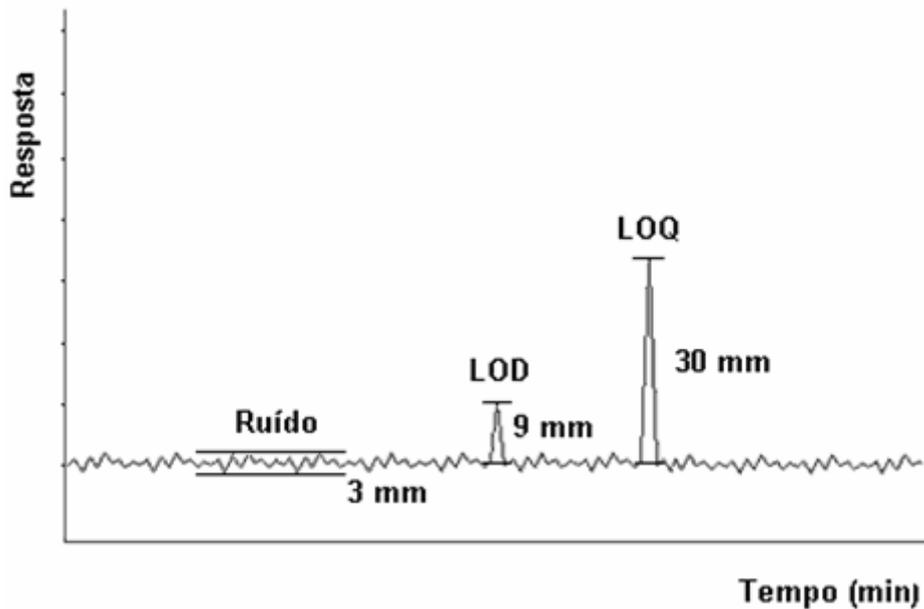


Figura 15. Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de LOD e LOQ

3.10.3 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

O valor numérico usado para avaliar a precisão em termos de desvio padrão relativo (RSD), pode ser calculado através da Equação (2) (RIBANI *et al.*, 2004; GARP, 1999).

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

onde:

s = estimativa de desvio padrão absoluto = $\{\sum(x_i - x_m)^2 / N - 1\}^{1/2}$

x_i = valores individuais

x_m = média das medidas em replicatas

N = número de medidas.

A precisão do instrumento foi obtida através das seis injeções de cada concentração das soluções analíticas no sistema GC×GC-μECD, efetuadas no estudo da linearidade.

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}) do método por GC×GC-μECD, utilizaram-se 2 dias e 2 operadores diferentes na execução da etapa de extração e análise.

3.10.4 Ensaio de fortificação para avaliação da recuperação (exatidão)

Os ensaios de fortificação e de recuperação têm por objetivo a avaliação da exatidão e precisão do método como um todo. Neste trabalho, a exatidão foi calculada pela Equação (3) e é expressa em percentagem (INMETRO, 2003):

$$R (\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (3)$$

onde:

C_1 = concentração determinada na amostra fortificada

C_2 = concentração determinada na amostra não fortificada

C_3 = concentração teórica na amostra fortificada

O procedimento de fortificação foi realizado 6 vezes ($n = 6$) para cada nível de fortificação (3 níveis). Também realizou-se 6 vezes a análise da amostra “branco” para verificação da real ausência desses compostos na matriz. Este extrato “branco” também foi utilizado para o preparo das soluções analíticas, quando em extrato da matriz.

3.10.5 Avaliação do efeito matriz

Para a avaliação da existência do efeito matriz nos extratos nas análises por GC×GC, realizou-se a comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas em solvente (acetato de etila) e daquelas obtidas com soluções analíticas

preparadas no extrato da matriz (tomate). O cálculo foi efetuado através da Equação (4).

$$EfeitoMatriz(\%) = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (4)$$

onde:

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

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A análise por GC×GC-μECD dos pesticidas piretróides bifentrina, ciflutrina, esfenvalerato, fenpropatrina, fenvalerato, permetrina *cis* e permetrina *trans* em tomate fortificado, empregando os métodos QuEChERS e mini-Luke modificados, gerou os resultados descritos a seguir.

4.1 Condições cromatográficas otimizadas para análise dos resíduos de pesticidas por GC×GC-μECD

4.1.1 Coluna cromatográfica e programação de temperatura

Os resultados a seguir foram obtidos empregando como primeira coluna uma VF-5 (30 m de comprimento, 0,25 mm de d.i. e 0,25 μm de espessura de filme) e como segunda coluna uma VB-50 (0,5 m de comprimento, 0,1 mm de d.i. e 0,1 μm de espessura de filme).

O programa de temperatura do forno da coluna selecionado foi o P3* (conforme Tabela 6), o qual proporcionou melhores resultados na separação dos compostos em estudo, totalizando em 25 minutos o tempo da análise cromatográfica.

4.1.2 Escolha da melhor vazão do gás de arraste

O estudo da melhor vazão do gás de arraste foi realizado utilizando-se a programação de temperatura P3*, conforme item 3.6.2. A vazão que proporcionou melhores resultados para os pesticidas avaliados foi a de 1,0 mL min⁻¹, que foi verificado pela melhor resolução dos picos cromatográficos. Esta vazão foi mantida constante durante toda a corrida. Percebeu-se que, utilizando a vazão de 1,2 mL min⁻¹, a resolução não foi adequada para os picos relacionados a permetrina *cis* e *trans*, sendo este o motivo para que esta vazão não fosse a escolhida. Eficiência

semelhante foi verificada utilizando tanto a vazão 0,8 quanto a vazão 1,0 mL min⁻¹, sendo assim optou-se pela vazão 1,0 mL min⁻¹ por resultar em uma análise mais rápida.

4.1.3 Condições cromatográficas

Para o injetor, a temperatura utilizada foi de 280 °C, com um volume de injeção de 1 µL no modo *splitless*. Para o detector, a temperatura foi 300 °C e a melhor vazão do gás *make-up* (nitrogênio) foi de 60 mL min⁻¹.

Dessa forma, as condições cromatográficas utilizadas para a separação dos compostos em estudo foram as seguintes:

- 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 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;
- Tempo de modulação: 5 s;
- Tempo total de corrida: 25 min;
- Temperatura do detector µECD: 300 °C;
- Velocidade de aquisição dos dados pelo µECD: 50 Hz;
- Vazão do gás *make up* (nitrogênio) no detector: 60 mL min⁻¹.

Com estas condições, o perfil de um cromatograma de separação dos pesticidas estudados pode ser observado na Figura 16, obtido com a injeção de 1 µL de uma solução analítica contendo 0,2 mg L⁻¹ de cada pesticida. É importante ressaltar que os isômeros fenvalerato e esfenvalerato, assim como, permetrina *cis* e *trans*, foram quantificados juntos, uma vez que os Limites Máximos de Resíduos também são fornecidos para cada par destes isômeros e não isoladamente, conforme demonstrado no item 2.3.4.

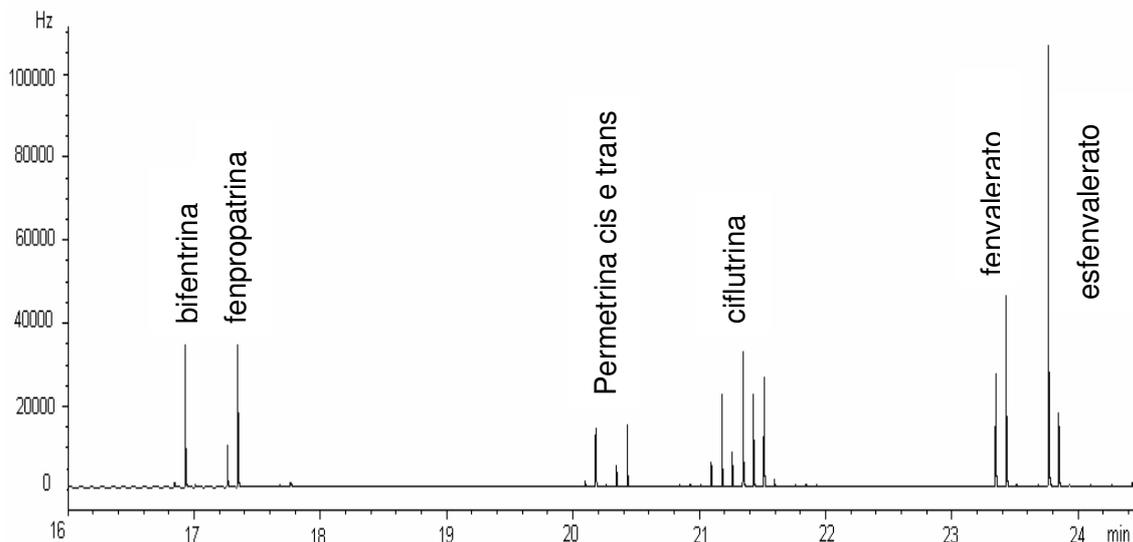


Figura 16 - Cromatograma em 1D da solução analítica $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ contendo uma mistura dos pesticidas estudados preparada em solvente, obtido por GC×GC- μ ECD conforme condições descritas no item 4.1.3

4.2 Determinação de resíduos de pesticidas por GC×GC- μ ECD utilizando extração pelos métodos QuEChERS e mini-Luke modificados e utilizando o modulador com ar comprimido

Neste trabalho, a identificação dos compostos de interesse foi realizada através da injeção de cada pesticida separadamente e a integração das áreas dos picos para a quantificação dos pesticidas foi realizada manualmente usando o *software HP Chemstation*.

A Figura 17 apresenta os cromatogramas obtidos por GC×GC- μ ECD de uma solução analítica $0,5 \text{ mg/L}^{-1}$ contendo uma mistura dos pesticidas estudados, preparada no extrato da matriz (tomate) obtida pelo método QuEChERS modificado com visualização em uma dimensão (1D) no cromatograma A e em duas dimensões (2D) no cromatograma B. A Figura 18 apresenta a mesma comparação, entretanto, com o extrato obtido pelo método mini-Luke modificado.

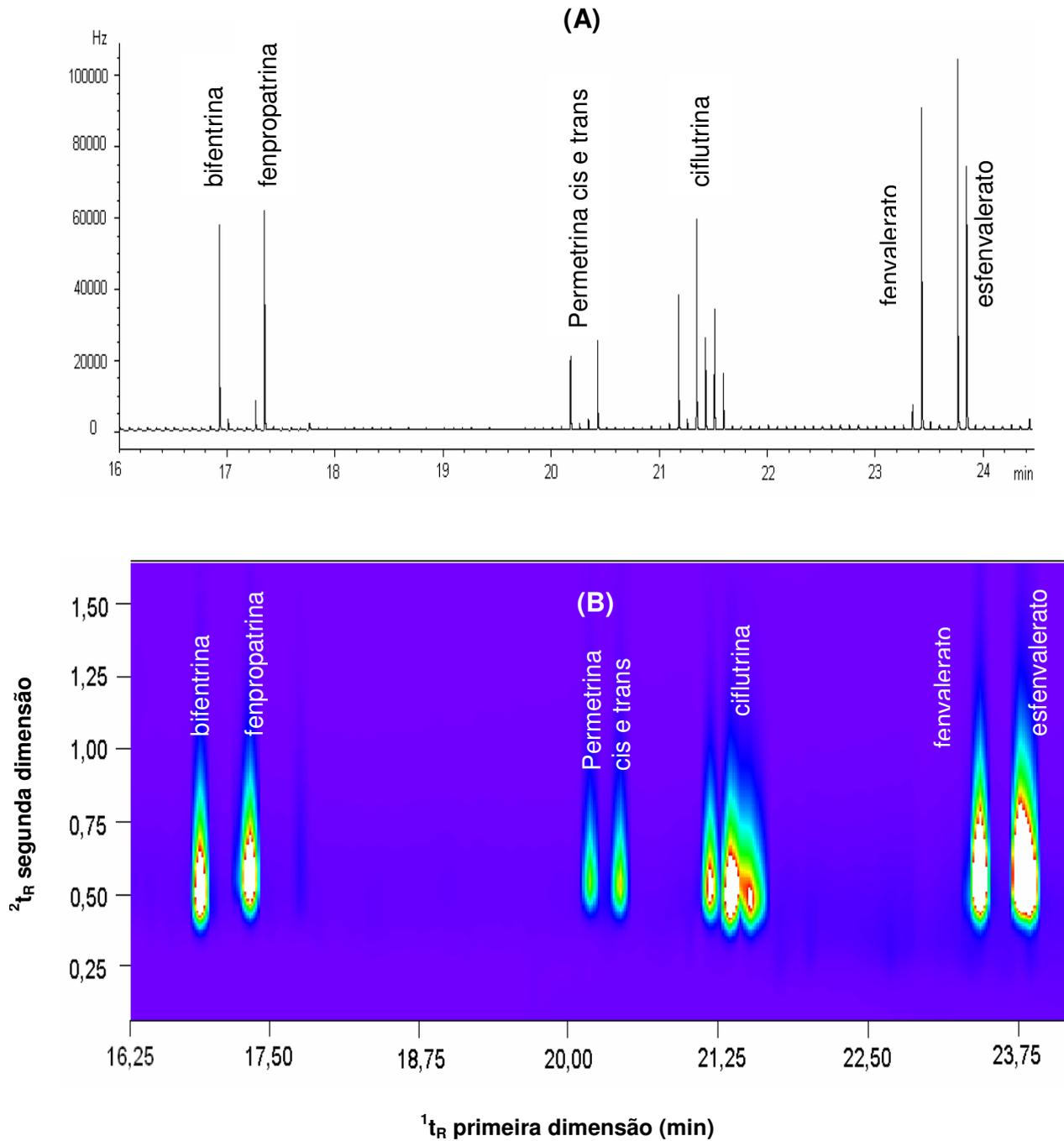


Figura 17 – Cromatograma da solução analítica $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, contendo uma mistura dos pesticidas estudados, preparada no extrato da matriz obtida pelo método QuEChERS modificado conforme condições descritas no item 4.1.3 (A) visualização em 1D (B) visualização em 2D

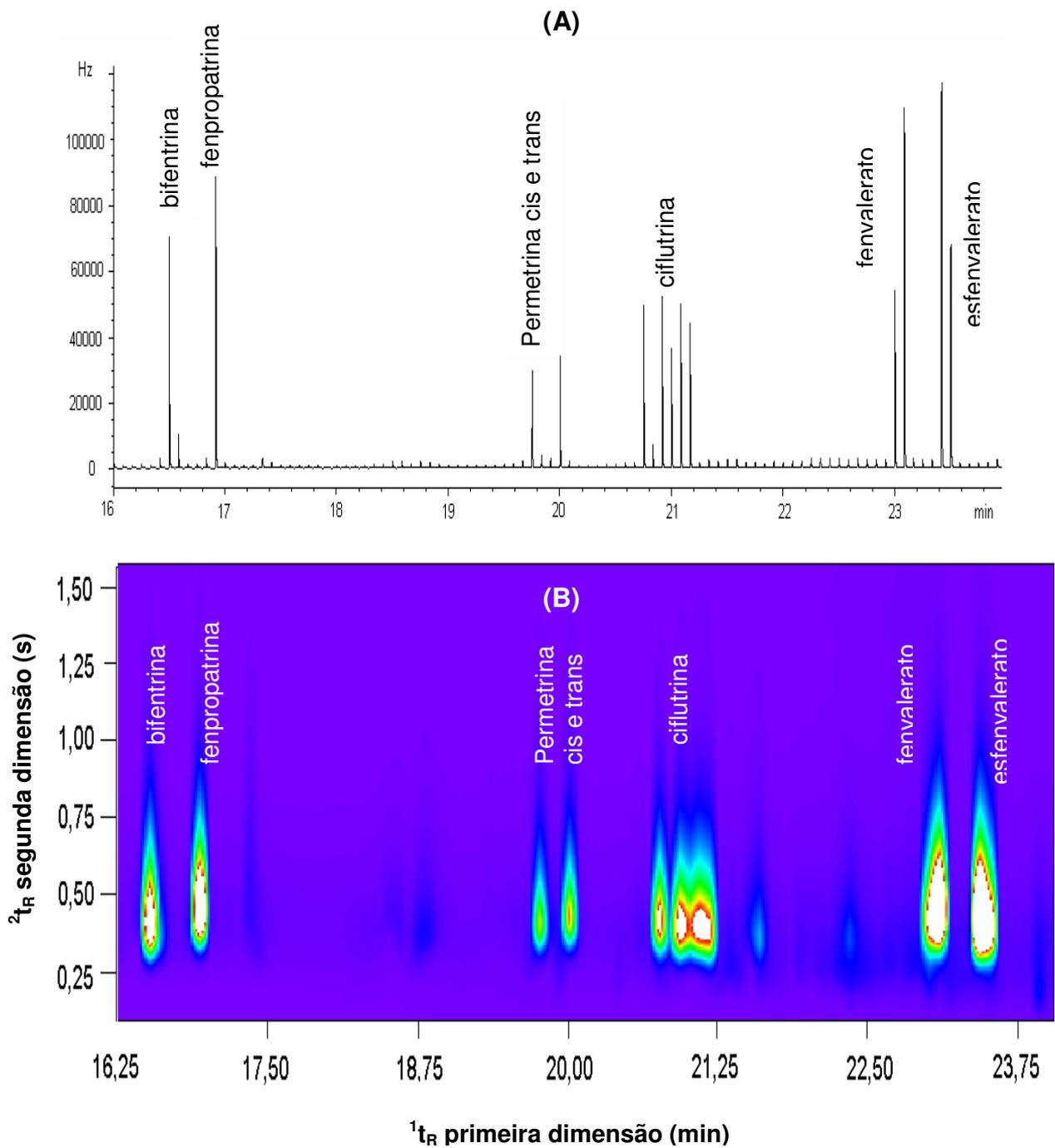


Figura 18 – Cromatograma da solução analítica $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, contendo uma mistura dos pesticidas estudados, preparada no extrato da matriz e obtida pelo método mini-Luke modificado conforme condições descritas no item 4.1.3 (A) visualização em 1D e (B) visualização em 2D

4.2.1 Análise dos solventes e reagentes pelos métodos de extração QuEChERS e mini-Luke modificados

Ao realizar-se a análise dos solventes e reagentes, conforme descrito no item 3.9, não se observou nenhuma contaminação dos solventes e reagentes utilizados para a extração dos pesticidas em tomate, tanto pelo método QuEChERS quanto pelo método mini-Luke modificados.

4.3 Validação dos métodos de extração para análise de resíduos de pesticidas em tomate

Todas as soluções analíticas utilizadas foram preparadas no solvente acetato de etila e no extrato da matriz (tomate), tanto pelo método QuEChERS modificado quanto pelo método mini-Luke modificado, sendo possível avaliar o efeito da presença deste extrato. O efeito matriz pode influenciar nos resultados, dependendo, principalmente, dos compostos em estudo, da técnica cromatográfica empregada e da matriz utilizada.

4.3.1 Linearidade das curvas analíticas

4.3.1.1 Método QuEChERS modificado

As Tabelas 7 e 8 apresentam as equações das curvas analíticas para os pesticidas analisados em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz, respectivamente, sendo que o primeiro ponto da curva corresponde ao limite de quantificação do método para o respectivo pesticida.

Tabela 7 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos pesticidas em acetato de etila utilizando o método QuEChERS modificado

Pesticida	Equação da reta ($y = ax + b$)	r^2	Intervalo linear (mg L^{-1})
Bifentrina	$y = 40320x + 434,04$	0,9991	0,01 - 1,0
Ciflutrina	$y = 121012x + 103,05$	0,9992	0,02 - 1,0
Fenpropratrina	$y = 45418x + 287,86$	0,9990	0,01 - 1,0
Fenvalerato e esfenvalerato	$y = 193713x + 847,69$	0,9991	0,01 - 1,0
Permetrina <i>cis</i> e <i>trans</i>	$y = 31999x + 359,57$	0,9986	0,02 - 1,0

Tabela 8 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos pesticidas no extrato da matriz utilizando o método QuEChERS modificado

Pesticida	Equação da reta ($y = ax + b$)	r^2	Intervalo linear (mg L^{-1})
Bifentrina	$y = 33001x + 454,72$	0,9995	0,01 - 1,0
Ciflutrina	$y = 94123x + 210,2$	0,9992	0,02 - 1,0
Fenpropratrina	$y = 36873x + 100,18$	0,9995	0,01 - 1,0
Fenvalerato e esfenvalerato	$y = 155591x + 1150,5$	0,9994	0,01 - 1,0
Permetrina <i>cis</i> e <i>trans</i>	$y = 26129x + 1999,29$	0,9999	0,02 - 1,0

Analisando as equações das curvas obtidas pode-se concluir que o modelo linear é bastante adequado já que os coeficientes de determinação (r^2) foram iguais ou maiores que 0,9986 para as curvas analíticas preparadas em solvente (acetato de etila) e maiores ou iguais que 0,9992 para as curvas preparadas no extrato da matriz, o que é satisfatório segundo a literatura (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003).

4.3.1.2 Método mini-Luke modificado

As Tabelas 9 e 10 apresentam as equações das curvas analíticas para os pesticidas analisados em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz,

respectivamente, neste caso, utilizando o método de extração mini-Luke modificado. Novamente, o primeiro ponto da curva corresponde ao limite de quantificação do método para o respectivo pesticida.

Tabela 9 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos pesticidas em acetato de etila utilizando o método mini-Luke modificado

Pesticida	Equação da reta ($y = ax + b$)	r^2	Intervalo linear (mg L^{-1})
Bifentrina	$y = 40149x + 651,07$	0,9992	0,02 - 1,0
Ciflutrina	$y = 97035x + 103,05$	0,9995	0,05 - 1,0
Fenpropratrina	$y = 46498x + 274,55$	0,9998	0,02 - 1,0
Fenvalerato e esfenvalerato	$y = 144846x + 814,34$	0,9998	0,02 - 1,0
Permetrina <i>cis</i> e <i>trans</i>	$y = 32772x + 330,61$	0,9993	0,05 - 1,0

Tabela 10 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos pesticidas no extrato da matriz utilizando o método mini-Luke modificado

Pesticida	Equação da reta ($y = ax + b$)	r^2	Intervalo linear (mg L^{-1})
Bifentrina	$y = 39187x + 576,95$	0,9997	0,02 - 1,0
Ciflutrina	$y = 94714x + 1897,6$	0,9955	0,05 - 1,0
Fenpropratrina	$y = 42395x + 668,8$	0,9990	0,02 - 1,0
Fenvalerato e esfenvalerato	$y = 148983x + 3545,1$	0,9965	0,02 - 1,0
Permetrina <i>cis</i> e <i>trans</i>	$y = 31136x + 1107,9$	0,9988	0,05 - 1,0

Da mesma maneira que no método anterior pode-se concluir que o modelo linear é bastante adequado já que os valores de r^2 foram iguais ou maiores que 0,9992 para as curvas preparadas em solvente (acetato de etila) e iguais ou maiores que 0,9955 para as curvas preparadas no extrato da matriz.

Estes resultados demonstram que o método QuEChERS modificado forneceu valores de r^2 mais apropriados que no caso do mini-Luke modificado, uma vez que

no método QuEChERS esses valores foram iguais ou maiores que 0,9992 para as curvas preparadas no extrato da matriz. Outra observação importante é que os cromatogramas das soluções analíticas preparadas no extrato, quando obtidos pelo método QuEChERS modificado apresentam ruído da linha base menos intensos, conforme demonstrado na Figura 19, a qual mostra os cromatogramas obtidos por GC×GC- μ ECD do “branco” do extrato obtidos pelos métodos QuEChERS e mini-Luke modificados.

Observando estes cromatogramas, nota-se que o ruído é maior utilizando o método mini-Luke (cromatograma B), uma vez que esse método faz uso de um homogeneizador (Ultraturrax), o qual promove maior trituração da amostra de tomate, o que fornece ao extrato uma maior quantidade de compostos provenientes da matriz, gerando um maior ruído no cromatograma. Por outro lado, durante a extração baseada no método QuEChERS (cromatograma A), a agitação é realizada manualmente, sem promover grande extração dos componentes da matriz, o que gerou um menor ruído ao sistema.

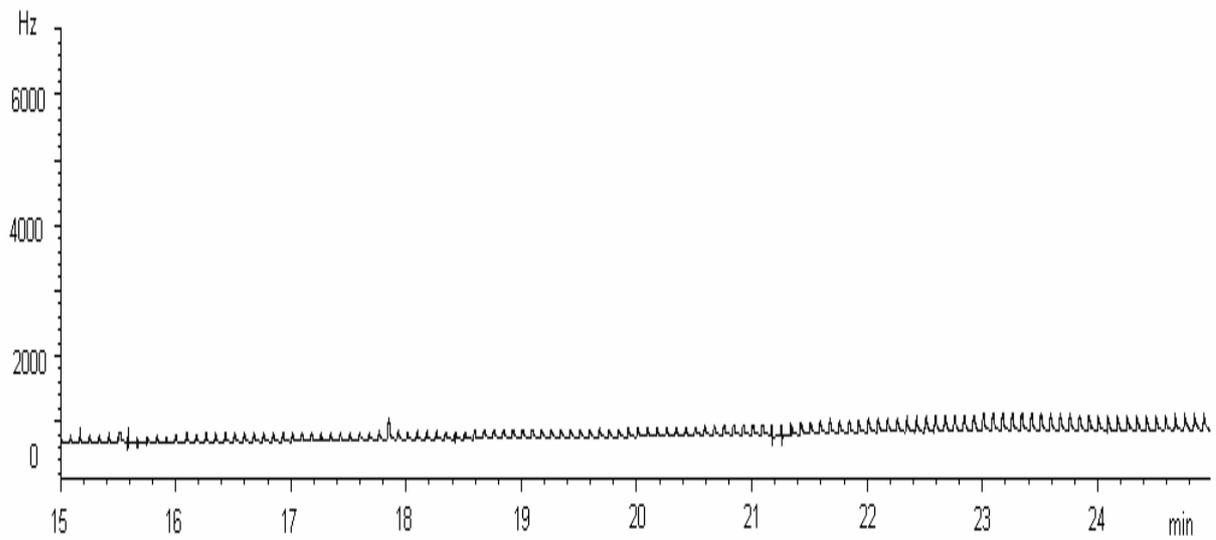
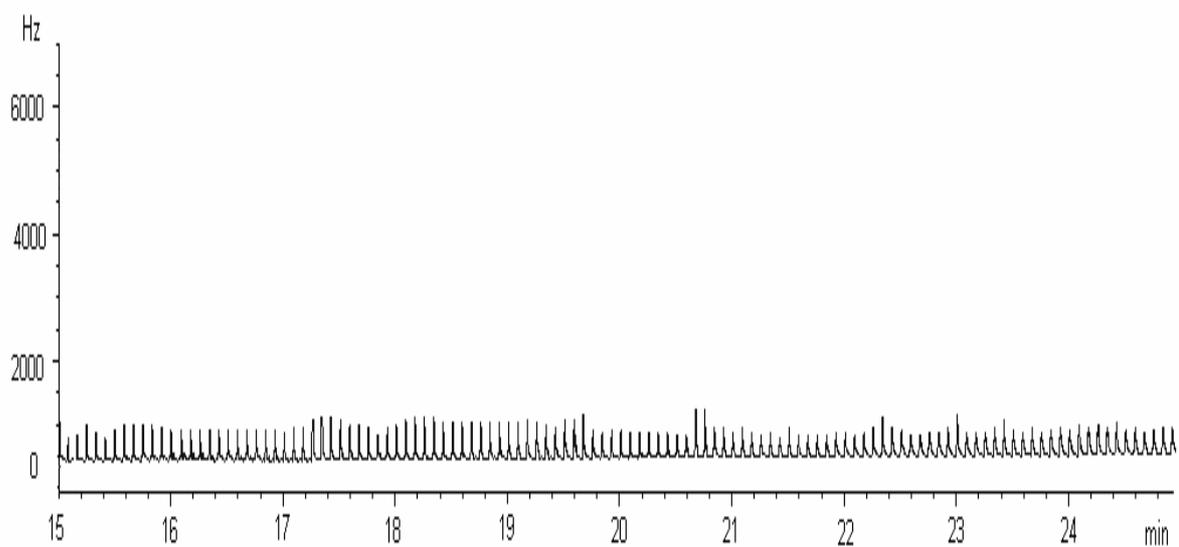
**(A)****(B)**

Figura 19 - Cromatogramas do “branco” do extrato da matriz obtidos por GC×GC-μECD utilizando: (A) método QuEChERS modificado e (B) método mini-Luke modificado

4.3.2 Limite de detecção e quantificação

4.3.2.1 Método QuEChERS modificado

Os valores de LOD e LOQ no solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz estão apresentados na Tabela 11.

Neste estudo, para quantificação dos pesticidas utilizou-se as curvas analíticas preparadas no extrato da matriz. Portanto, os valores de LOD e LOQ que devem ser considerados são também os obtidos no extrato da matriz.

Tabela 11 - Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método no solvente e no extrato da matriz para os pesticidas estudados utilizando o método QuEChERS modificado

Pesticida	Solvente		Extrato da matriz			
	LOD _i (mg L ⁻¹)	LOQ _i (mg L ⁻¹)	LOD _i (mg L ⁻¹)	LOD _m (mg kg ⁻¹)	LOQ _i (mg L ⁻¹)	LOQ _m (mg kg ⁻¹)
Bifentrina	0,002	0,006	0,003	0,003	0,01	0,01
Ciflutrina	0,003	0,01	0,006	0,006	0,02	0,02
Fenpropatrina	0,002	0,006	0,003	0,003	0,01	0,01
Fenvalerato e esfenvalerato	0,002	0,006	0,003	0,003	0,01	0,01
Permetrina <i>cis</i> e <i>trans</i>	0,003	0,01	0,006	0,006	0,02	0,02

FC= 1 (portanto, LOD_i = LOD_m e LOQ_i = LOQ_m)

Os limites de detecção e de quantificação no extrato da matriz são considerados satisfatórios, quando comparados aos Limites Máximos de Resíduos permitidos pela ANVISA, *Codex Alimentarius* e União Européia, pois permitem determinar concentrações abaixo ou pelo menos igual a estes limites.

A Figura 20 compara os cromatogramas de uma solução analítica preparada no extrato da matriz (A) e preparada no solvente acetato de etila (B).

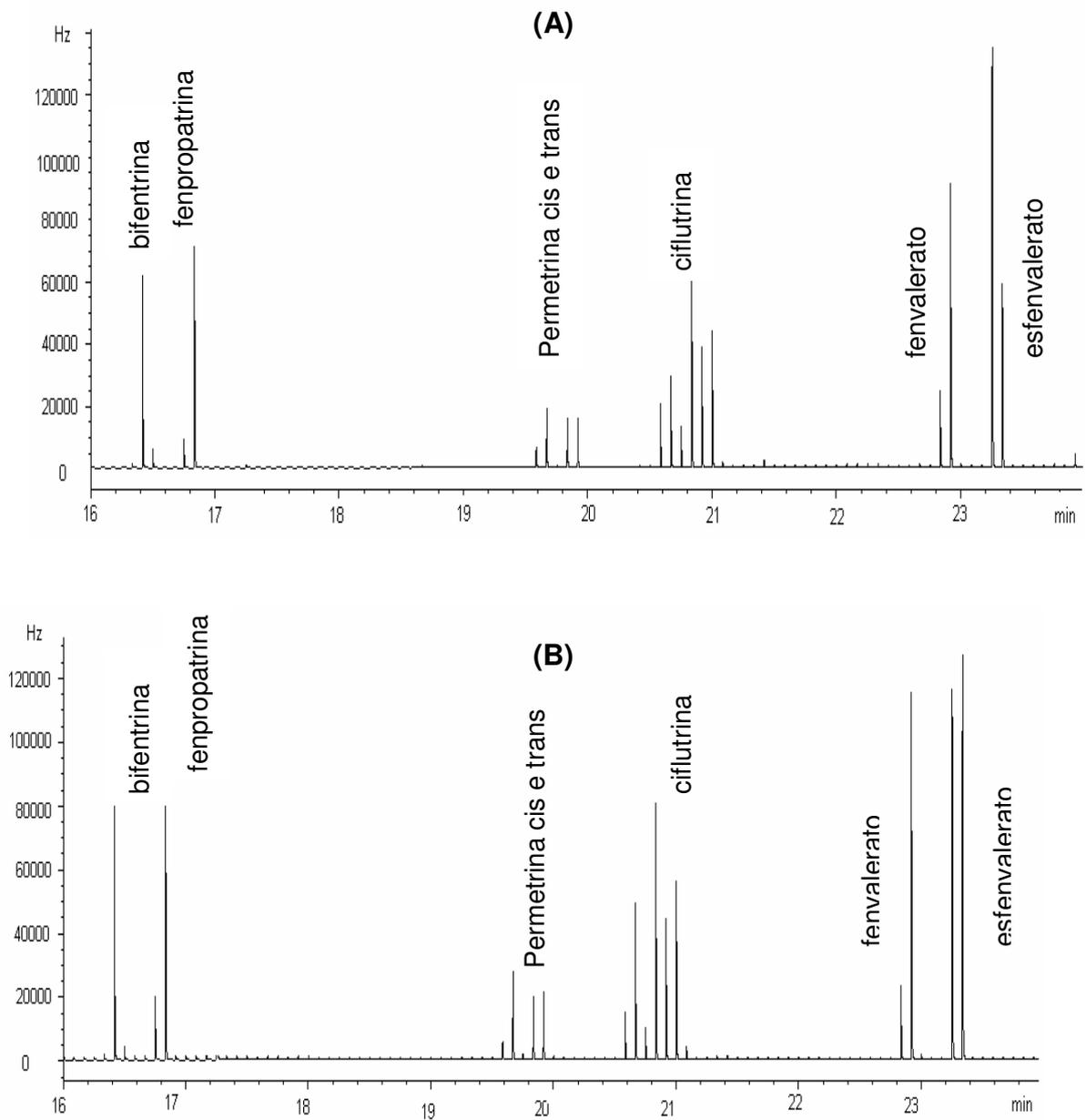


Figura 20 - Cromatogramas de uma solução analítica 0,5 mg L⁻¹, contendo uma mistura dos pesticidas estudados, conforme condições descritas no item 4.1.3 (A) preparada no extrato da matriz pelo método QuEChERS modificado e (B) preparada em solvente (acetato de etila)

4.3.2.2 Método mini-Luke modificado

Os valores de LOD e LOQ no extrato da matriz obtidos utilizando o método de extração mini-Luke modificado estão apresentados na Tabela 12. Novamente, para

quantificação utilizaram-se as curvas analíticas preparadas no extrato da matriz, portanto, os valores de LOD e LOQ que devem ser considerados são também os obtidos no extrato da matriz.

Tabela 12 - Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método no solvente e no extrato da matriz para os pesticidas estudados utilizando o método mini-Luke modificado

Pesticida	Solvente		Extrato da matriz			
	LOD _i (mg L ⁻¹)	LOQ _i (mg L ⁻¹)	LOD _i (mg L ⁻¹)	LOD _m (mg kg ⁻¹)	LOQ _i (mg L ⁻¹)	LOQ _m (mg kg ⁻¹)
Bifentrina	0,002	0,006	0,006	0,006	0,02	0,02
Ciflutrina	0,003	0,01	0,015	0,015	0,05	0,05
Fenpropatrina	0,002	0,006	0,006	0,006	0,02	0,02
Fenvalerato e esfenvalerato	0,002	0,006	0,006	0,006	0,02	0,02
Permetrina <i>cis</i> e <i>trans</i>	0,003	0,01	0,015	0,015	0,05	0,05

FC= 1 (portanto, LOD_i = LOD_m e LOQ_i = LOQ_m)

Os limites de detecção e de quantificação no extrato da matriz são considerados satisfatórios, quando comparados aos Limites Máximos de Resíduos permitidos pelo *Codex Alimentarius* e União Européia, pois permitem determinar concentrações abaixo ou pelo menos igual aos limites estabelecidos.

Com relação aos limites máximos de resíduos permitidos pela ANVISA, apenas o valor de LOQ encontrado para ciflutrina não é satisfatório, pois o valor de LOQ está acima desse limite, demonstrando que a quantificação deste pesticida não é segura em concentrações abaixo de 0,05 mg kg⁻¹. No entanto, o Limite Máximo de Resíduos para este pesticida em tomate é de 0,02 mg kg⁻¹. Para os demais pesticidas, os limites de quantificação são considerados satisfatórios, pois permitem determinar concentrações abaixo ou iguais aos limites máximos de resíduos fornecidos pela ANVISA.

A partir destas conclusões e observando as Tabelas 11 e 12, notam-se valores de LOD e LOQ mais apropriados utilizando o método QuEChERS modificado

para todos os pesticidas estudados. Uma provável explicação para esse fato é o aumento do ruído utilizando o método mini-Luke, conforme descrito no item 4.3.2.1.

A Figura 21 compara um cromatograma de uma solução analítica preparada no extrato da matriz pelo método mini-Luke modificado (A) e um cromatograma de um padrão preparado no solvente (B).

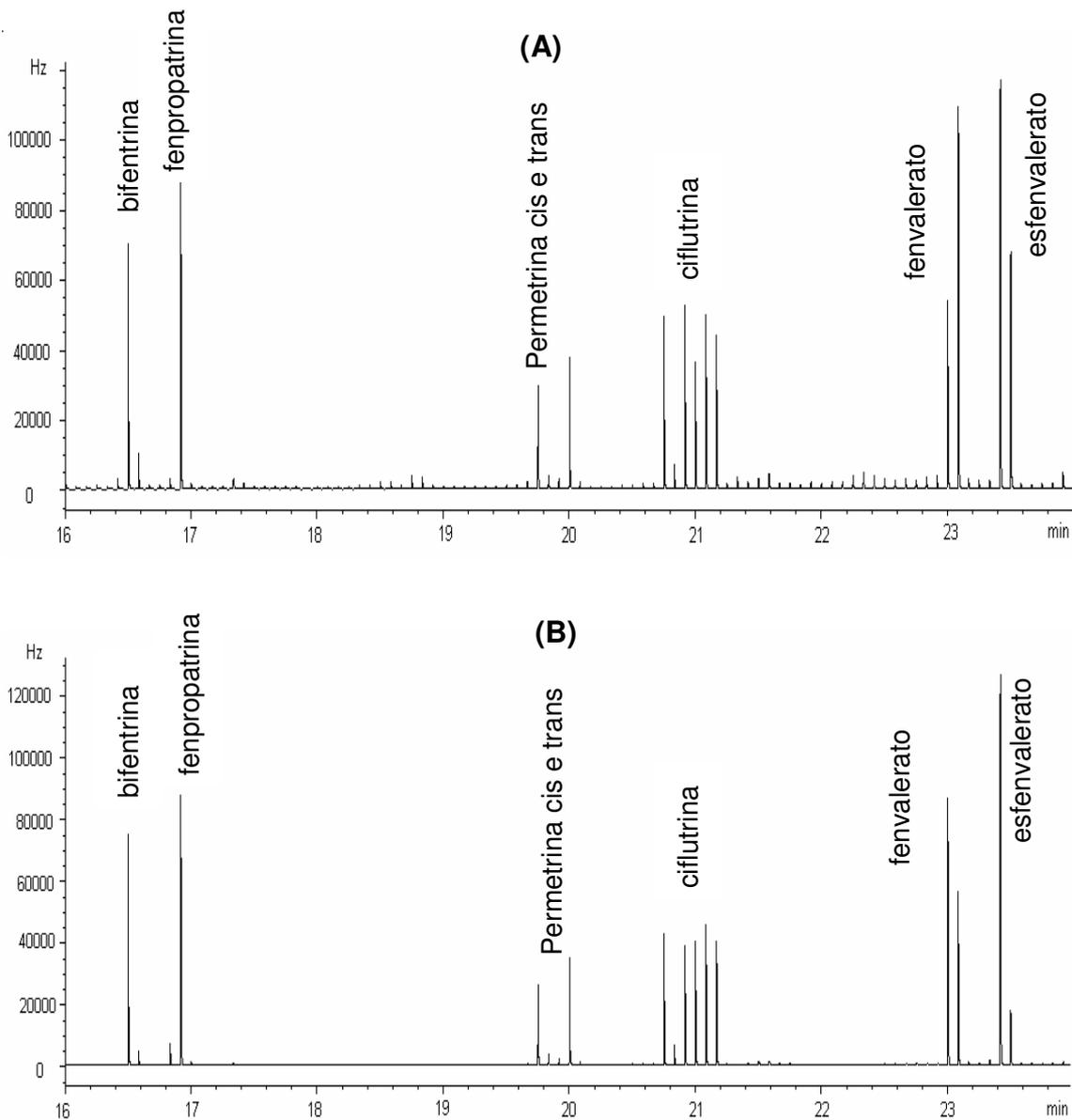


Figura 21 - Cromatogramas de uma solução analítica $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, contendo uma mistura dos pesticidas estudados, conforme condições descritas no item 4.1.3 (A) preparada no extrato da matriz pelo método mini-Luke modificado e (B) preparada em solvente (acetato de etila)

4.3.3 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

De acordo com a literatura, para validação de métodos cromatográficos, na faixa de concentração avaliada nesse trabalho, recomenda-se precisão com RSD \leq 20% (GARP, 1999).

A precisão do instrumento (repetitividade e precisão intermediária) foi determinada injetando-se 6 vezes a solução referente a cada nível da curva analítica (n= 6) preparado no extrato da matriz.

O teste de precisão intermediária foi realizado empregando analistas e dias diferentes dos utilizados para os estudos de repetitividade.

4.3.3.1 Método QuEChERS modificado

Para determinação da repetitividade para o instrumento injetou-se 6 vezes cada nível da curva analítica de acordo com o item 4.3.1.1. Para determinação da precisão intermediária injetou-se 6 vezes cada nível de uma curva analítica com os seguintes pontos: 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,5 mg L⁻¹.

A repetitividade (RSD_r) e a precisão intermediária (RSD_{pi}) para o instrumento nos níveis de concentração utilizados na elaboração da curva analítica, encontram-se na Tabela 13. Os valores para a repetitividade dos pesticidas ficaram entre 2,7 e 9,3%, com valores médios entre 5,7 e 7,9%, e para a precisão intermediária ficaram entre 2,1 e 9,5%, com valores médios entre 5,5 e 6,0%.

Tabela 13 - Precisão do instrumento utilizando o método QuEChERS modificado

Pesticida	RSD _r (%)		RSD _{pi} (%)	
	Faixa de variação	Média	Faixa de variação	Média
Bifentrina	2,7 – 7,9	5,7	3,7 – 7,3	5,5
Ciflutrina	3,1 – 9,5	6,5	3,9 – 8,6	6,0
Fenpropatrina	4,0 – 8,5	7,0	3,9 – 8,7	5,8
Fenvalerato e esfenvalerato	3,4 – 8,9	7,1	2,1 – 9,4	5,7
Permetrina <i>cis</i> e <i>trans</i>	4,4 – 9,3	7,9	4,0 – 9,5	5,7

n= 6 (6 injeções para cada diferente solução analítica da curva analítica).

Os resultados de precisão para o método estão demonstrados juntamente com os resultados de recuperação, na Tabela 15, sendo que os valores para a repetitividade dos pesticidas ficaram entre 3,1 e 8,7% e para a precisão intermediária ficaram entre 2,1 e 8,3%.

Os resultados obtidos para as concentrações estudadas estão dentro do limite sugerido pela literatura para validação de métodos cromatográficos, no qual a precisão deve apresentar $RSD \leq 20\%$ (GARP, 1999).

4.3.3.2 Método mini-Luke modificado

Para determinação da repetitividade para o instrumento injetou-se 6 vezes cada nível da curva analítica de acordo com o item 4.3.1.1. Para determinação da precisão intermediária injetou-se 6 vezes cada nível de uma curva analítica com os seguintes pontos: 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹.

A Tabela 14 demonstra a repetitividade (RSD_r) e a precisão intermediária (RSD_{pi}) para o instrumento. Os valores para a repetitividade dos pesticidas ficaram entre 1,2 e 9,9%, com valores médios entre 3,2 e 6,7, e para a precisão intermediária ficaram entre 2,5 e 6,4%, com valores médios entre 3,9 e 5,2.

Tabela 14 - Precisão do instrumento utilizando o método mini-Luke modificado

Pesticida	RSD _r (%)		RSD _{pi} (%)	
	Faixa de variação	Média	Faixa de variação	Média
Bifentrina	1,2 – 5,4	3,2	3,4 – 4,5	3,9
Ciflutrina	3,8 – 8,5	5,9	2,5 – 5,6	4,7
Fenpropatrina	2,8 – 5,3	4,1	2,8 – 5,2	3,9
Fenvalerato e esfenvalerato	2,6 – 9,7	5,9	4,1 – 5,9	5,2
Permetrina <i>cis</i> e <i>trans</i>	4,2 – 9,9	6,7	3,9 – 6,4	5,0

n= 6 (6 injeções para cada diferente solução analítica da curva analítica).

Observando a Tabela 14, nota-se novamente que os resultados obtidos para as concentrações estudadas estão dentro do limite sugerido, no qual a precisão deve apresentar $RSD \leq 20\%$ (GARP, 1999).

Os resultados de precisão para o método estão demonstrados juntamente com os resultados de recuperação na Tabela 16, sendo que os valores para a repetitividade dos pesticidas ficaram entre 3,3 e 9,3% e para a precisão intermediária ficaram entre 1,1 e 10,7%.

Comparando os resultados de precisão para os dois métodos utilizados, demonstrados nas Tabelas 15 e 16, percebe-se que, em ambos os métodos, os valores estão abaixo de 20%, o que está de acordo com o sugerido pela literatura (GARP, 1999). Além disso, nota-se que o método QuEChERS forneceu resultados com maior precisão em termos de RSD_r e RSD_{pi}, porém, essa diferença não é muito significativa, chegando no máximo a 8,7% para o método QuEChERS modificado e 10,7% para o método mini-Luke modificado.

4.3.4 Recuperação dos analitos

Neste trabalho, seguiu-se a recomendação de que, para a validação de métodos cromatográficos, as recuperações devem estar entre 70 e 120%. A

recuperação depende de fatores como a amostra utilizada, o procedimento de extração e a faixa de concentração do analito (GARP, 1999).

4.3.4.1 Método QuEChERS modificado

A Tabela 15 apresenta os valores de recuperação, RSD_r e RSD_{pi} para o método, obtidos para as fortificações em diferentes níveis de concentração, utilizando o procedimento descrito no item 3.8.1.

Tabela 15 - Recuperação, RSD_r e RSD_{pi} do método para os pesticidas utilizando o método QuEChERS modificado

Pesticida	Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Repetitividade		Precisão intermediária	
		Recuperação (%)	RSD_r (%)	Recuperação (%)	RSD_{pi} (%)
Bifentrina	20	102,2	3,1	92,6	8,3
	50	104,1	6,8	100,4	8,1
	200	98,8	5,8	101,3	4,0
Ciflutrina	20	90,9	8,7	102,4	2,9
	50	102,9	5,2	101,0	3,4
	200	96,2	7,2	88,4	5,6
Fenpropatrina	20	92,8	4,2	80,6	6,7
	50	105,5	6,5	102,3	2,6
	200	98,3	7,0	81,5	1,9
Fenvalerato e esfenvalerato	20	90,2	7,3	86,7	4,2
	50	99,0	7,1	100,8	2,1
	200	97,9	8,2	103,5	4,8
Permetrina <i>cis</i> e <i>trans</i>	20	98,3	8,7	81,0	6,3
	50	104,4	6,7	99,0	2,3
	200	101,3	5,2	96,5	5,3

n=6 (6 extrações \times 1 injeção de cada extrato)

No estudo de repetitividade, as recuperações para os pesticidas ficaram entre 90,2 e 105,5%, com $RSD \leq 8,7\%$. No ensaio de precisão intermediária as recuperações variaram entre 80,6 e 103,5%, com $RSD \leq 8,3\%$. Sendo assim, todos os valores obtidos apresentaram-se dentro do intervalo recomendado pela literatura (GARP, 1999).

A Figura 22 apresenta os cromatogramas de um extrato da matriz (tomate) “branco” fortificado com os pesticidas em estudo ao nível de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ e o seu respectivo cromatograma visualizado em duas dimensões.

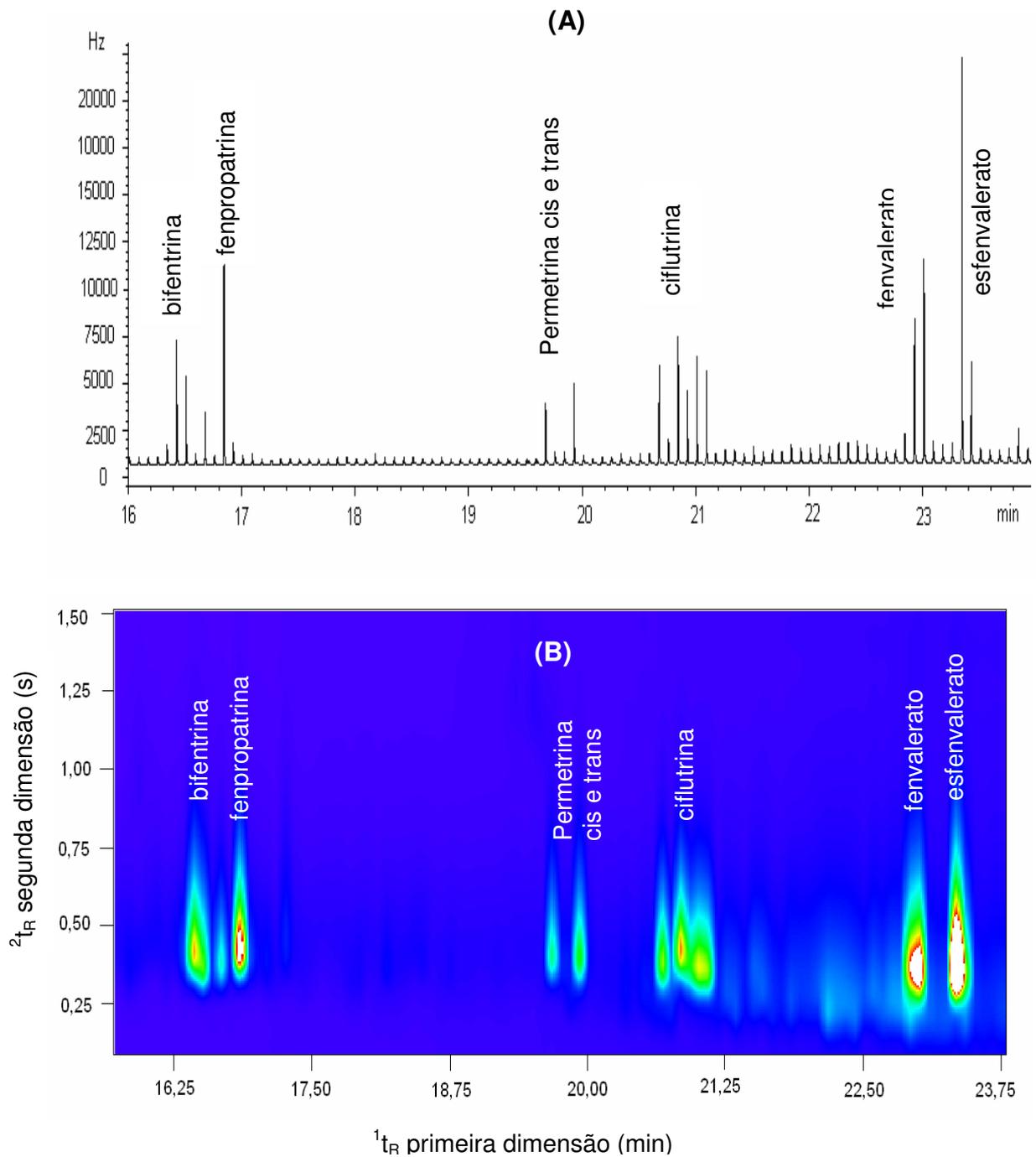


Figura 22 – Cromatogramas do extrato da matriz “branco” fortificado ao nível de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ com os pesticidas analisados por GC \times GC- μ ECD utilizando o método QuEChERS modificado, conforme condições descritas no item 4.1.3 (A) visualização em 1D e (B) visualização em 2D

4.3.4.2 Método mini-Luke modificado

A Tabela 16 apresenta os valores de recuperação, RSD_r e RSD_{pi} obtidos para as fortificações, em diferentes níveis de concentração, utilizando o procedimento descrito no item 3.8.2, baseado no método mini-Luke modificado.

Tabela 16 - Recuperação, RSD_r e RSD_{pi} do método para os pesticidas utilizando o método mini-Luke modificado

Pesticida	Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Repetitividade		Precisão intermediária	
		Recuperação (%)	RSD_r (%)	Recuperação (%)	RSD_{pi} (%)
Bifentrina	50	110,8	8,4	92,2	1,6
	200	94,1	7,6	102,8	1,1
	500	95,2	7,7	103,1	5,6
Ciflutrina	50	109,3	7,7	104,1	5,8
	200	90,7	9,3	108,7	6,9
	500	95,6	5,6	103,3	5,9
Fenpropatrina	50	101,8	3,3	101,9	5,9
	200	87,0	6,5	102,6	7,3
	500	87,9	8,8	105,6	5,8
Fenvalerato e esfenvalerato	50	100,1	3,9	90,4	5,5
	200	94,0	9,3	98,6	10,7
	500	100,0	6,5	100,2	8,2
Permetrina <i>cis</i> e <i>trans</i>	50	91,2	8,7	98,2	8,3
	200	86,2	9,0	103,9	6,4
	500	88,9	9,0	103,5	5,3

n=6 (6 extrações \times 1 injeção de cada extrato)

No estudo de repetitividade, as recuperações para os pesticidas ficaram entre 86,2 e 110,8%, com $RSD \leq 9,3\%$. No ensaio de precisão intermediária as recuperações variaram entre 90,4 e 108,7%, com $RSD \leq 10,7\%$. Sendo assim, todos os valores obtidos apresentaram-se dentro do intervalo recomendado pela literatura (GARP, 1999).

Nota-se que ambos os métodos estudados resultaram em recuperações adequadas, demonstrando que são dois métodos confiáveis. Os resultados de recuperação ficaram todos dentro do intervalo recomendado pela literatura, ou seja, entre 70 e 120% (GARP, 1999).

A Figura 23 apresenta os cromatogramas de um extrato de tomate “branco” fortificado com os pesticidas estudados ao nível de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ e o seu respectivo cromatograma visualizado em duas dimensões.

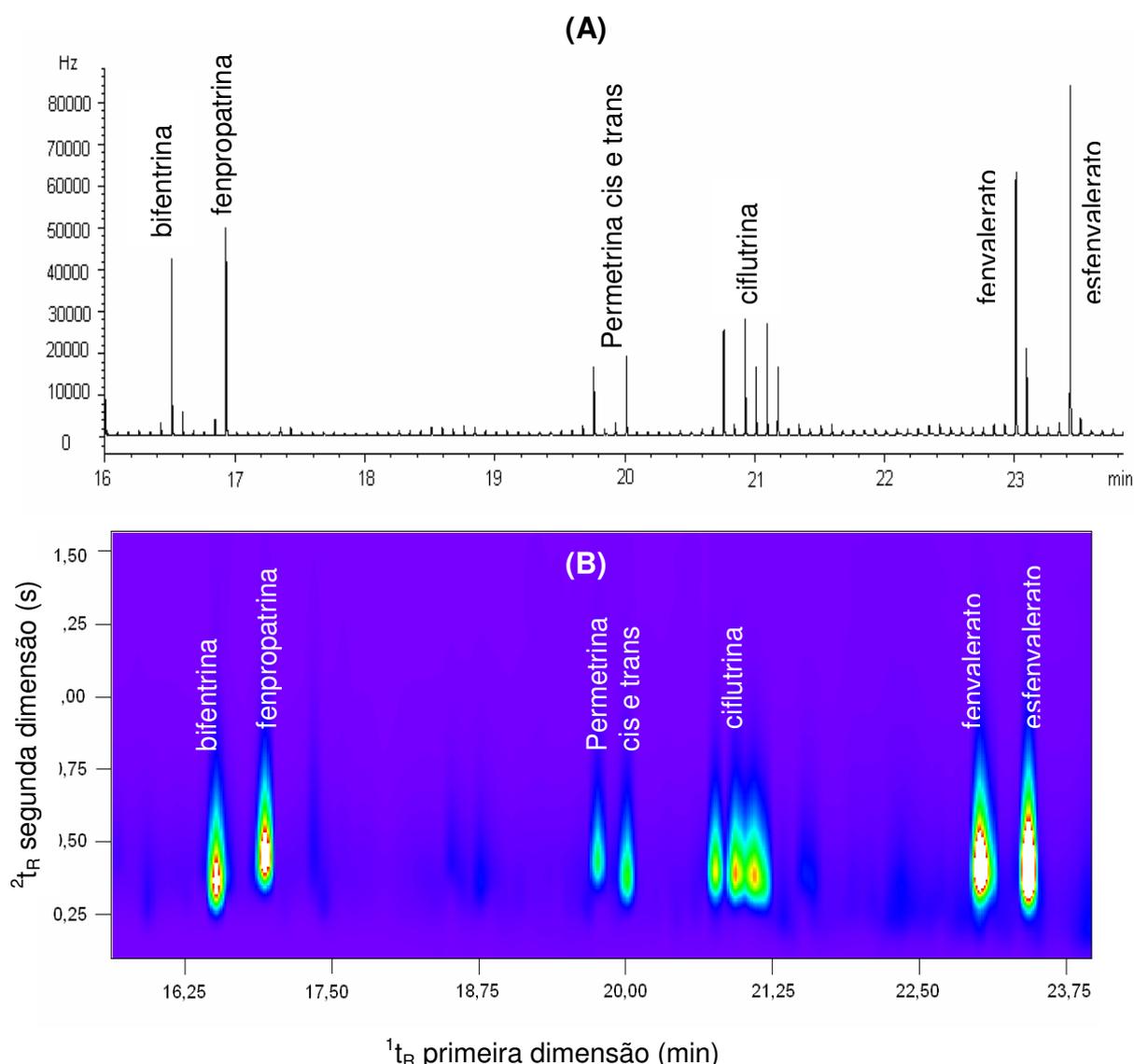


Figura 23 – Cromatogramas do extrato da matriz “branco” fortificado ao nível de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ com os pesticidas analisados por GC \times GC- μ ECD utilizando o método mini-Luke modificado, conforme condições descritas no item 4.1.3 (A) visualização em 1D e (B) visualização em 2D.

4.3.5 Efeito matriz

O efeito matriz sempre sofre variações ao longo do tempo e também varia dependendo das condições 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.

No estudo do efeito matriz verificou-se se a matriz exerceu efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal) sobre o resultado da análise. O efeito matriz negativo pode ser atribuído à possibilidade de ocorrer a interação de algum componente da matriz ou reagente adicionado durante extração com os pesticidas analisados, fazendo assim, com que ocorra uma diminuição do sinal analítico. O efeito matriz positivo é usualmente causado pelos componentes da matriz que evitam a capacidade de certos analitos de serem adsorvidos nos sítios ativos do sistema cromatográfico, resultando numa maior resposta do detector para os analitos na presença da matriz do que a resposta fornecida para os analitos provenientes de solução analítica preparada em solvente.

A avaliação do efeito matriz na análise cromatográfica de amostras de tomate foi realizada conforme descrito no item 3.10.5 e os resultados estão descritos a seguir.

4.3.5.1 Método QuEChERS modificado

As Figuras de 24 a 28 representam as curvas analíticas para os pesticidas analisados tanto em solvente quanto no extrato da matriz obtidas utilizando o método QuEChERS modificado onde se pode verificar a existência ou não de efeito matriz. Quando uma curva difere da outra, com uma variação maior que 10% entre os resultados obtidos para o solvente e para o extrato da matriz, considera-se que o efeito matriz começa a exercer influência nas análises (ZROSTLIKOVA & HAJŠLOVA, 2003).

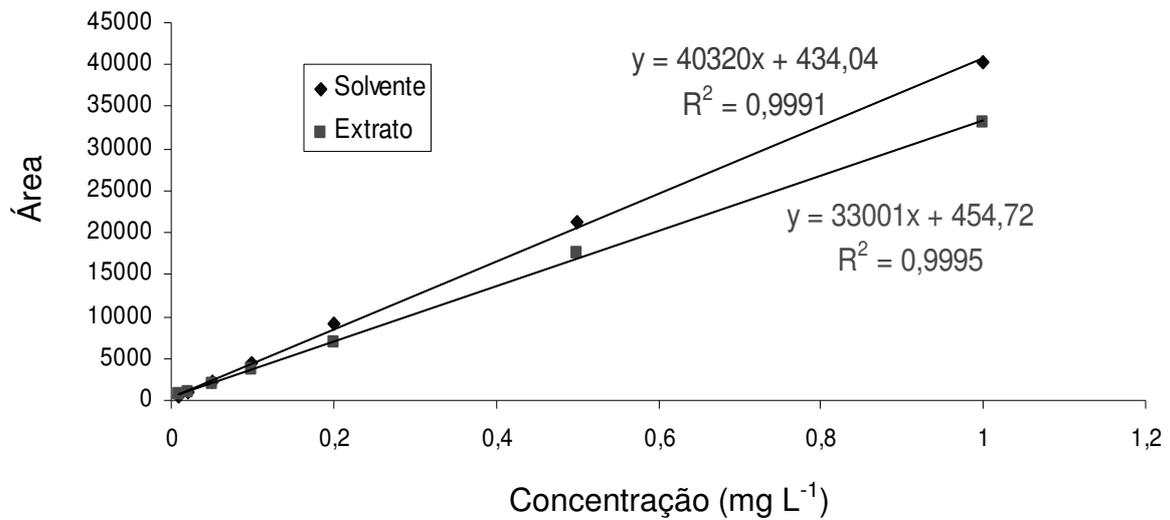


Figura 24 - Curva analítica do pesticida bifentrina preparado em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração QuEChERS modificado

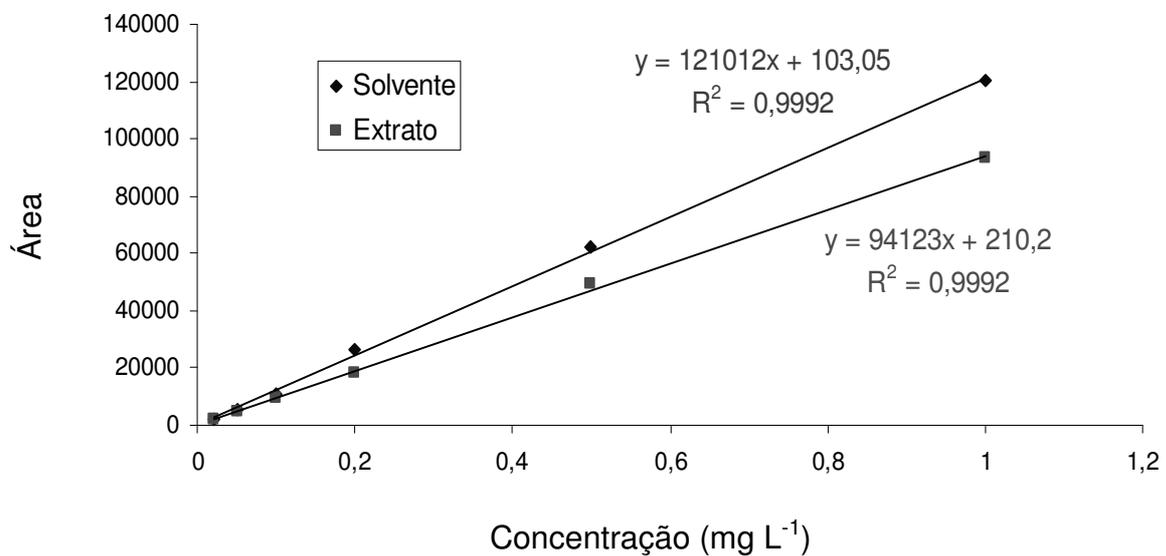


Figura 25 - Curva analítica do pesticida ciflutrina preparado em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração QuEChERS modificado

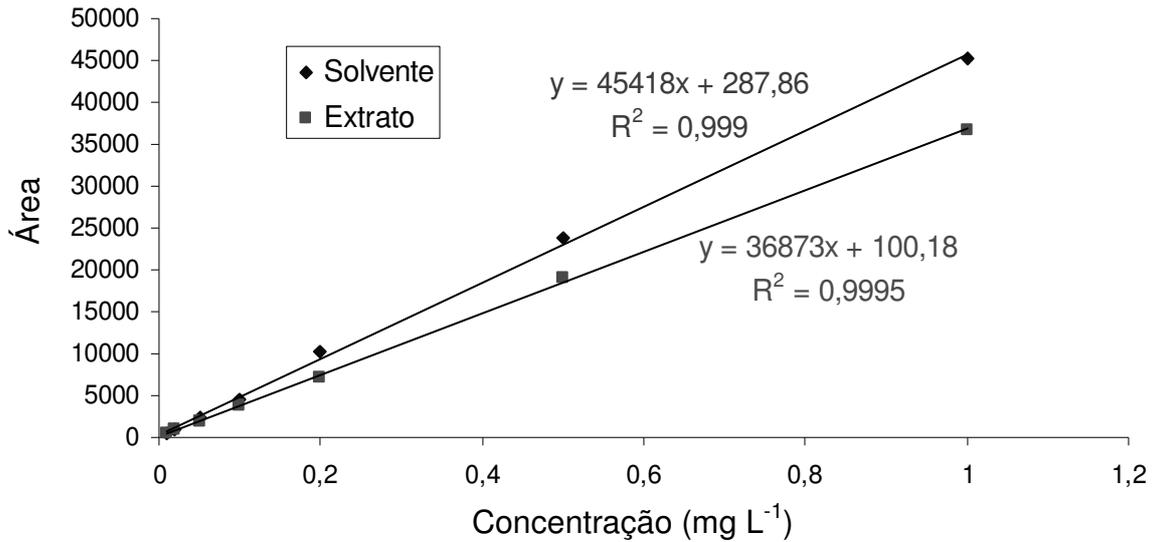


Figura 26 - Curva analítica do pesticida fenpropatrina preparado em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração QuEChERS modificado

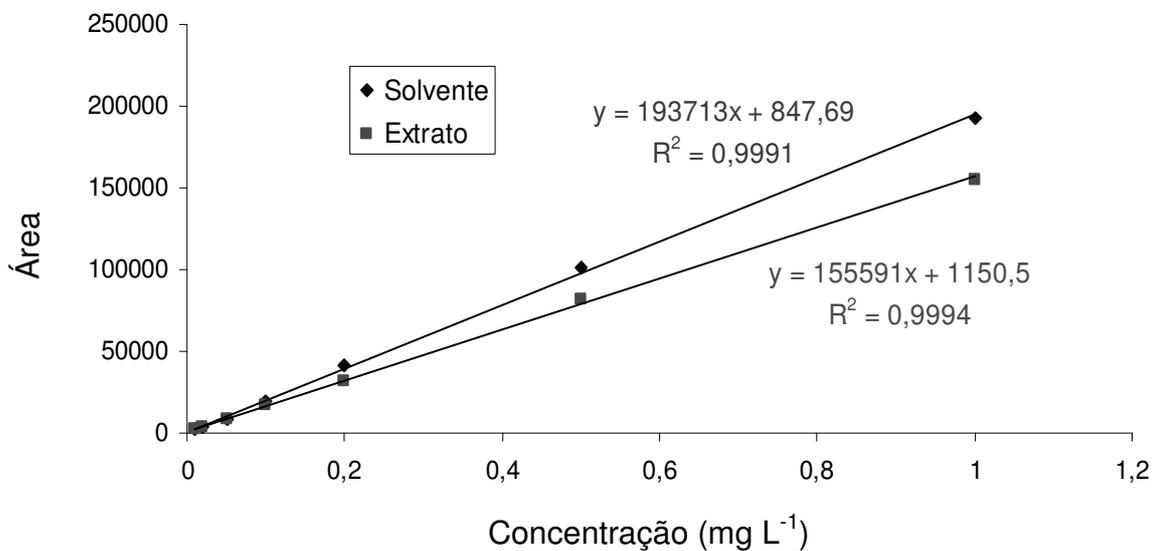


Figura 27 - Curva analítica dos pesticidas fenvalerato e esfenvalerato preparados em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração QuEChERS modificado

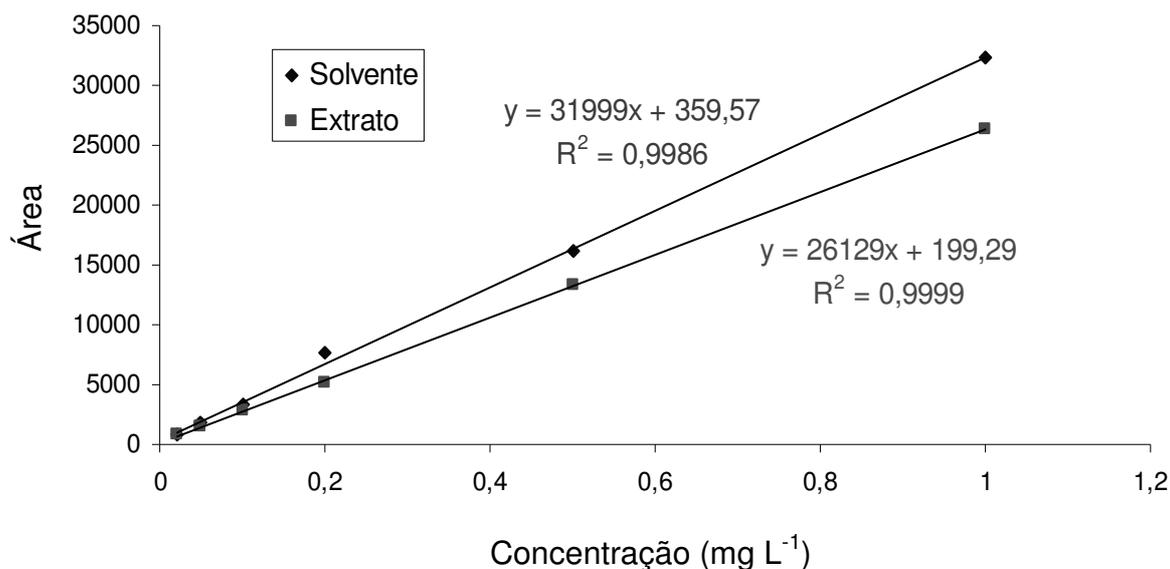


Figura 28 – Curva analítica dos pesticidas permetrina *cis* e *trans* preparados em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração QuEChERS modificado

Nota-se que todos os pesticidas estudados apresentaram considerável efeito matriz negativo, quando obtidos pelo método de extração QuEChERS modificado.

A partir destes resultados, pode-se dizer que, para a quantificação dos resíduos dos pesticidas estudados utilizando o método de extração QuEChERS modificado e analisados por GCxGC- μ ECD, as soluções analíticas devem ser preparadas no extrato da matriz.

4.3.5.2 Método mini-Luke modificado

As Figuras de 29 a 33 representam as curvas analíticas para os pesticidas analisados tanto em solvente quanto no extrato da matriz, utilizando o método mini-Luke modificado onde se pode observar os resultados do efeito matriz para este método.

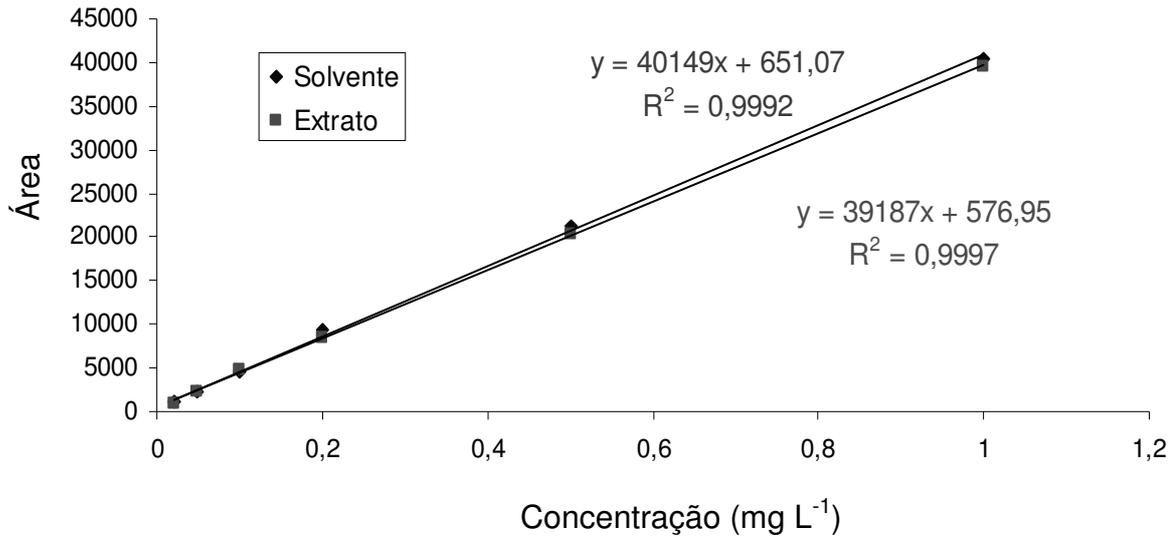


Figura 29 - Curva analítica do pesticida bifentrina preparado em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração mini-Luke modificado

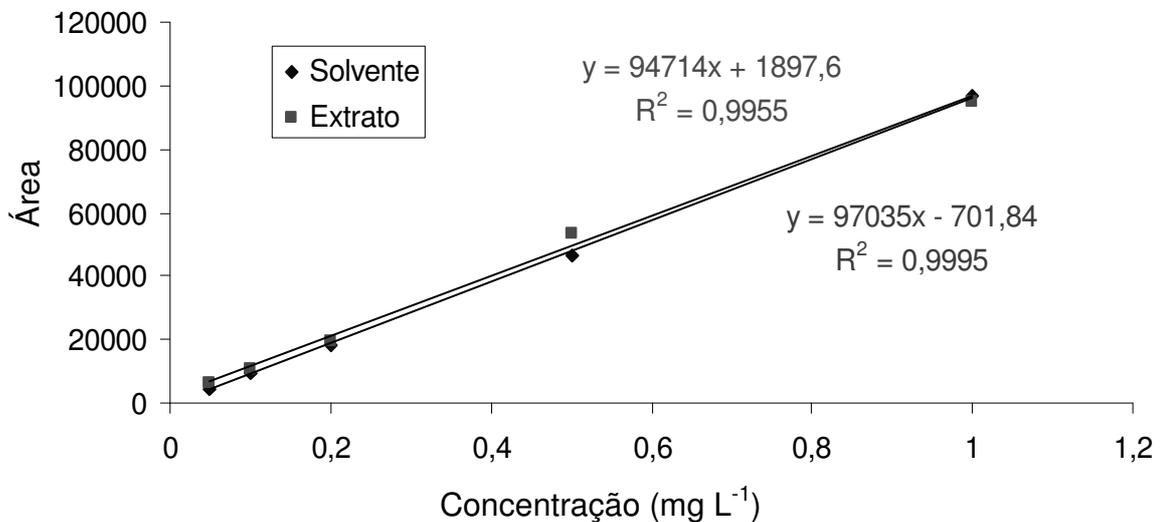


Figura 30 - Curva analítica do pesticida ciflutrina preparado em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração mini-Luke modificado

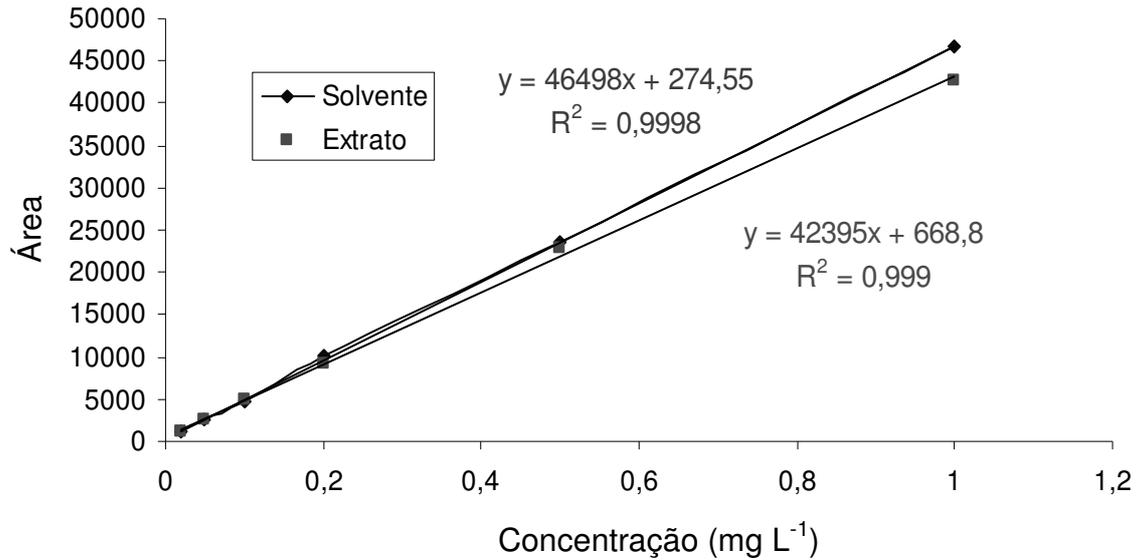


Figura 31 - Curva analítica do pesticida fenpropratrina preparado em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração mini-Luke modificado

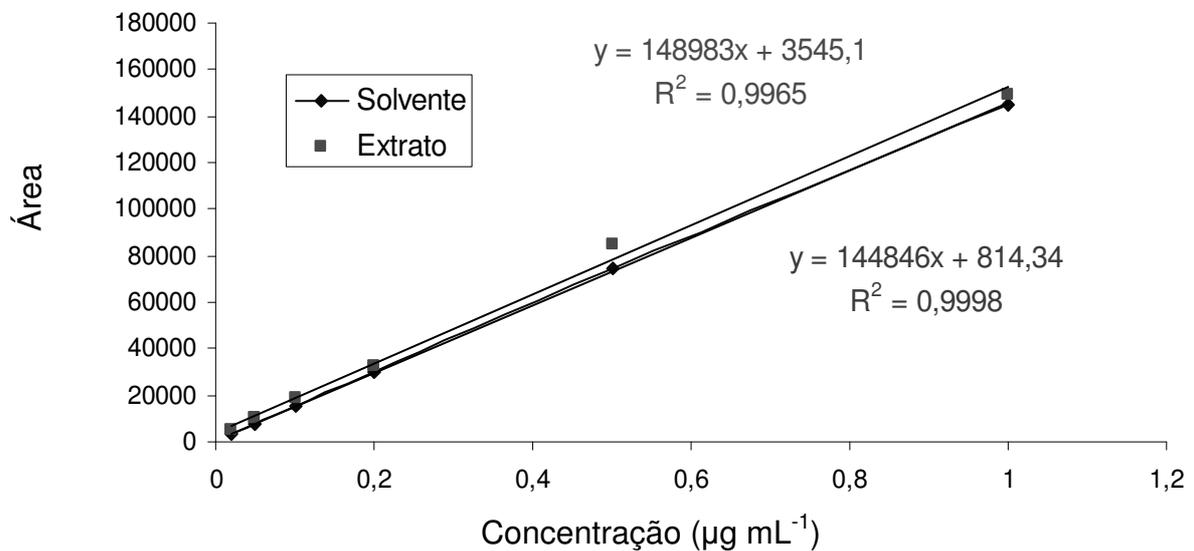


Figura 32 - Curva analítica dos pesticidas fenvalerato e esfenvalerato preparados em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração mini-Luke modificado

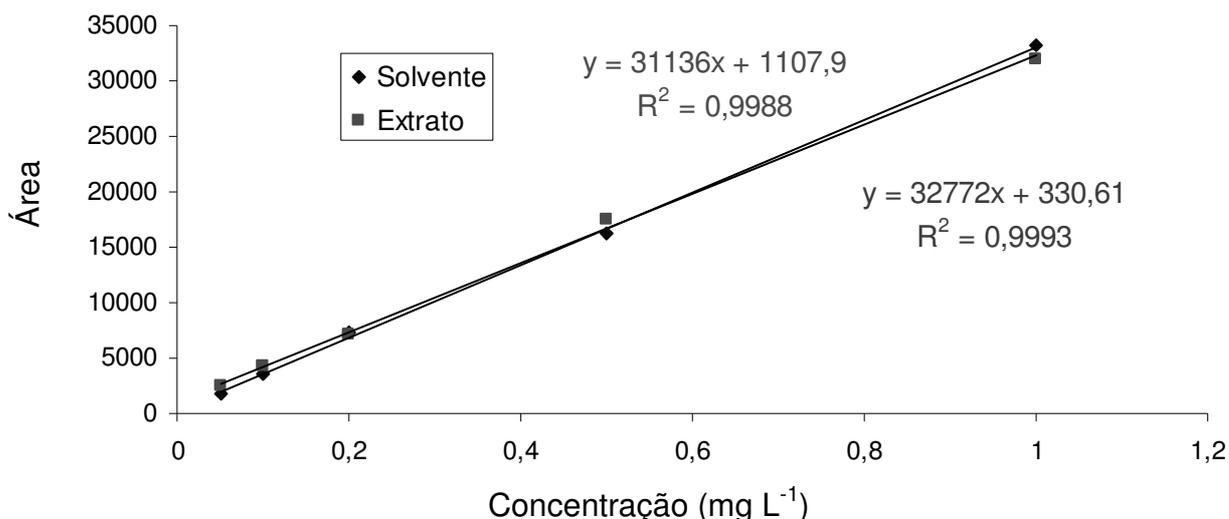


Figura 33 - Curva analítica dos pesticidas permetrina *cis* e *trans* preparados em solvente (acetato de etila) e no extrato da matriz obtido pelo método de extração mini-Luke modificado

Analisando as figuras acima, nota-se um menor efeito matriz utilizando o método mini-Luke modificado para todos os pesticidas estudados quando comparado com o método QuEChERS modificado. Percebe-se que, diferentemente da extração utilizando o método QuEChERS, onde todos os pesticidas estudados apresentaram considerável efeito matriz negativo, utilizando o método mini-Luke o efeito matriz teve resultados positivos e negativos, sendo que, muitas vezes, este efeito não foi significativo, ou seja, foi menor que 10%.

Mesmo alguns pesticidas não apresentando efeito matriz significativo, de maneira geral, para a quantificação dos pesticidas estudados nos extratos da matriz e utilizando o método de extração mini-Luke modificado, as soluções analíticas devem ser preparadas nos extratos da matriz, pelo fato de alguns pesticidas fornecerem um efeito matriz relativamente significativo.

4.4 Comparação entre os resultados obtidos pelo método QuEChERS e mini-Luke modificados

Além da comparação dos resultados por meio das tabelas anteriores, onde destacou-se as diferenças entre LOD, LOQ, precisão, exatidão e efeito matriz, algumas características destes dois métodos também devem ser detalhadas, pois proporcionam diferenças significativas durante a análise em termos de tempo, custo, facilidade, geração de resíduos, entre outros.

O método QuEChERS mostrou ser um procedimento mais simples, principalmente pela diferença no processo de agitação das amostras. Enquanto que a maioria dos métodos de extração utiliza agitação mecânica, o método QuEChERS faz uso de agitação manual, o que possui algumas vantagens, como por exemplo, a possibilidade de ser aplicado em qualquer laboratório ou a campo. Além disso, o fato da extração ser realizada em frasco fechado, não expondo o analista, e não havendo a necessidade de lavagem do homogeneizador entre uma amostra e outra, o que proporciona maior rapidez ao método, constituem algumas vantagens do método (ANASTASSIADES *et al.*, 2003)

Outra característica interessante que pôde ser observada é que o uso do homogeneizador Ultraturrax no método mini-Luke gerou um maior ruído da linha base nos cromatogramas em relação ao uso da agitação manual, a qual é mais branda, não promovendo a trituração do extrato como ocorreu no método mini-Luke modificado.

Outro ponto fundamental é em relação à quantidade de solvente utilizado em cada método. Enquanto que no método QuEChERS fez-se uso de apenas 10 mL de acetonitrila, no método mini-Luke, o volume total de solvente orgânico utilizado chega a 90 mL. Além do problema da geração de uma maior quantidade de resíduos, esta adição de solventes apolares também resulta na diluição do extrato.

Isso pode ser explicado pelo fato de que acetona e acetonitrila são miscíveis com água e promovem a extração em uma única fase quando em contato com a matriz. Porém, quando a extração é realizada com acetona (mini-Luke) há necessidade de adição de solventes apolares miscíveis em acetona para que ocorra a separação entre as fases (orgânica-água), uma vez que a acetona é muito miscível com água para ser separada sem utilizar solventes apolares. Este procedimento não

é necessário quando se utiliza a acetonitrila, uma vez que, apenas a adição de sais ao extrato faz com que ocorra tal separação (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; SCHENCK *et al.*, 2002).

A utilização de acetonitrila possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos provenientes da amostra, como ceras, gorduras e pigmentos. Este solvente também proporciona a extração de uma ampla faixa de pesticidas de diferentes polaridades e, quando acidificada, permite recuperações satisfatórias de pesticidas que geralmente apresentam problemas de estabilidade (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). No entanto, uma desvantagem da utilização da acetonitrila como solvente de extração é que esta apresenta maior custo quando comparada à acetona.

Outro ponto fundamental, que deve ser considerado, é a etapa de *clean-up*, a qual é muito importante para gerar confiabilidade aos resultados. Originalmente, no método QuEChERS, um *clean-up* diferente é utilizado. Um pequeno volume de extrato é colocado em contato com uma mistura de PSA e um agente secante, possibilitando que a redução de água residual e a etapa de *clean-up* ocorram simultaneamente. Esse procedimento de *clean-up* é chamado de extração em fase sólida dispersiva, onde o PSA remove eficientemente componentes muito polares da matriz, como ácidos orgânicos e alguns pigmentos (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Esta etapa de *clean-up* não faz parte do método mini-Luke, porém para efeitos de comparação de resultados, este foi realizado durante este trabalho.

A Tabela 17 resume os principais parâmetros de comparação entre os dois métodos estudados, incluindo os valores obtidos na validação dos métodos e parâmetros como solvente de extração utilizado, adição ou não de solvente apolar, toxicidade e custo do solvente de extração, entre outros.

TABELA 17 - Comparação entre os métodos de extração empregados: QuEChERS e mini-Luke modificados

Parâmetros de comparação	QuEChERS	Mini-Luke
LOD	0,003 - 0,006 mg kg ⁻¹	0,006 - 0,015 mg kg ⁻¹
LOQ	0,01 - 0,02 mg kg ⁻¹	0,02 - 0,05 mg kg ⁻¹
Linearidade	0,01 - 1,0 mg L ⁻¹	0,02 - 1,0 mg L ⁻¹
Precisão método (RSD _r)	≤ 8,7%	≤ 9,0%
Exatidão (recuperação)	90,2 - 105,5%	86,2 - 110,8%
Efeito matriz	efeito matriz negativo para todos os analitos	efeito matriz tanto positivo quanto negativo
Solvente de extração	acetonitrila	acetona
Adição de solvente apolar	não	sim
Quantidade final de solvente	10 mL	90 mL
Toxicidade dos solventes utilizados	menor	maior
Preço do solvente de extração	maior	menor
Agitação	manual	mecânica (Ultraturrax)
Ruído da linha base	menor	maior
Tempo	mais rápido	mais demorado
Simplicidade	mais simples	mais trabalhoso
Geração de resíduos	menor quantidade	maior quantidade

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que o desempenho de uma análise de resíduos de pesticidas está relacionado ao método de extração utilizado, ou seja, é dependente do solvente de extração escolhido, além de outros detalhes do procedimento de extração, como por exemplo, o tipo de agitação realizada, assim como a etapa de *clean-up*.

Ao empregar-se o método de extração com acetonitrila (método QuEChERS modificado) para extração dos pesticidas piretróides em estudo, obteve-se recuperações entre 90,2 e 105,5% com RSD menor que 8,7%, enquanto que utilizando o método de extração com acetona (método mini-Luke modificado) as recuperações ficaram entre 86,2 e 110,8% com RSD menor que 9,0%. Dessa maneira, percebe-se uma pequena variação nos resultados comparando os dois métodos realizados, sendo que ambos os resultados obtidos apresentaram-se dentro do intervalo recomendado pela literatura.

Em termos de LOD e LOQ, a diferença entre os resultados encontrados foi mais perceptível comparando os dois métodos de extração. Utilizando o método QuEChERS modificado os valores de LOQ ficaram entre 0,01 e 0,02 mg kg⁻¹, o que é considerado satisfatório, quando comparado aos Limites Máximos de Resíduos permitidos pela ANVISA, *Codex Alimentarius* e União Européia, pois estes valores de LOQ permitem determinar concentrações abaixo ou pelo menos igual aos limites máximos de resíduos dos compostos em estudo. Utilizando o método mini-Luke modificado, os valores de LOQ ficaram entre 0,02 e 0,05 mg kg⁻¹, sendo que, neste caso, o valor de LOQ encontrado para ciflutrina não foi satisfatório, pois este está acima do Limite Máximo de Resíduos permitido pela ANVISA. Para os demais pesticidas, os limites de quantificação são considerados satisfatórios, pois permitem determinar concentrações abaixo ou pelo menos igual aos limites máximos de resíduos fornecidos pela ANVISA, *Codex Alimentarius* e União Européia.

Com relação aos coeficientes de determinação (r^2) das curvas analíticas, percebeu-se que, utilizando o método QuEChERS modificado, estes valores foram maiores ou iguais a 0,9992 para as curvas preparadas no extrato da matriz, o que é satisfatório segundo a literatura. No caso do método mini-Luke modificado os valores de r^2 foram maiores ou iguais a 0,9955 para as curvas preparadas no extrato da

matriz, demonstrando, portanto, que o método QuEChERS modificado forneceu valores de r^2 mais apropriados que no caso do mini-Luke modificado.

Outra observação importante é que os cromatogramas das soluções analíticas no extrato obtido pelo método mini-Luke modificado apresentaram ruído da linha base mais intensos, uma vez que esse método faz uso de um homogeneizador (Ultraturrax), o qual promove maior trituração da amostra de tomate, o que fornece ao extrato uma maior quantidade de compostos provenientes da matriz, gerando um maior ruído no cromatograma. Por outro lado, durante a extração baseada no método QuEChERS, a agitação é realizada manualmente, sem promover grande extração dos componentes da matriz, o que gerou um menor ruído ao sistema.

Com relação ao efeito matriz, percebeu-se que todos os pesticidas estudados apresentaram considerável efeito matriz negativo quando obtidos pelo método de extração QuEChERS modificado, o que pode ser atribuído à possibilidade de ocorrer a interação de algum componente da matriz ou reagente adicionado durante a extração com os pesticidas analisados, resultando numa diminuição do sinal analítico. Por outro lado, percebeu-se um menor efeito matriz utilizando o método mini-Luke modificado para todos os pesticidas estudados quando comparado com o método QuEChERS modificado. Diferentemente da extração utilizando o método QuEChERS, onde todos os pesticidas estudados apresentaram considerável efeito matriz negativo, utilizando o método mini-Luke o efeito matriz teve tanto resultados positivos como negativos, sendo que, muitas vezes, este efeito não foi significativo, ou seja, foi menor que 10%.

Constatou-se que o método QuEChERS é um procedimento mais simples, principalmente pela diferença no processo de agitação das amostras, o que resulta na possibilidade de ser aplicado em qualquer laboratório ou a campo. Além disso, a extração é realizada em frasco fechado, não expondo o analista e não havendo a necessidade de lavagem do homogeneizador entre uma amostra e outra, o que proporciona maior rapidez ao método, minimizando o risco de contaminação. Outra vantagem importante do método QuEChERS é a menor quantidade de solvente utilizado. No entanto, uma desvantagem da utilização de acetonitrila como solvente de extração é que esta apresenta maior custo quando comparada à acetona.

Este estudo mostrou também que o sistema GC×GC- μ ECD com modulador de duplo jato de ar comprimido possibilita a redução dos custos da análise, com

relação ao modulador que utiliza CO₂ líquido, e que esta combinação pode ser utilizada em análises de pesticidas piretróides em tomate, pois obteve-se baixos valores de LOD e LOQ, boa precisão e exatidão da resposta analítica e, além disso, não foram observados problemas de sobreposição de outros compostos presentes na matriz.

Sendo assim, pode-se afirmar que os objetivos traçados para este trabalho foram satisfatoriamente alcançados, uma vez que foi possível avaliar e comparar dois métodos de extração de resíduos de pesticidas bastante utilizados, o método QuEChERS e o método mini-Luke, utilizando um sistema GC×GC-μECD.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Desenvolvimento e validação de métodos utilizando GC×GC para determinar diferentes classes de pesticidas, tais como carbamatos, organofosforados, organoclorados e piretróides na cultura de tomate;

Utilização do sistema GC×GC na resolução de problemas relacionados a picos sobrepostos, obtidos principalmente quando utiliza-se cromatografia gasosa convencional, na análise de resíduos de pesticidas em amostras complexas;

Comparação dos resultados obtidos utilizando os métodos de extração QuEChERS e mini-Luke modificados na análise de resíduos de pesticidas em diferentes matrizes de frutas e vegetais;

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

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAHCHOUR, M. *et al.* Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC): I. Introduction and instrumental set-up. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 438-454, 2006.

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

ANDEF (Associação Nacional de Defesa Vegetal), Análise de Resíduos nos Alimentos, 2008. Disponível em <<http://www.andef.com.br/2003/saud02.asp>>. Acesso em 20 de fevereiro de 2008.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Agrotóxicos e toxicologia. Monografias de produtos agrotóxicos, 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>> Acesso em 29 de janeiro de 2008.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Consulta Pública nº 55, de 11 de setembro de 2006. D.O.U de 12/09/2006. Disponível em <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B16124-1-0%5D.PDF>>. Acesso em 20 de fevereiro de 2008.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Informações médicas de urgência nas intoxicações por produtos agrotóxicos, 2008a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/informed/pagina3.htm>>. Acesso em 27 de janeiro de 2008.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). SIA – Sistema de Informações sobre Agrotóxicos, 2008b. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/agrosia/asp/frm_pesquisa_ingrediente.asp>. Acesso em 25 de fevereiro de 2008.

AUGUSTO, F.; VALENTE, A. L. P.; RIEDO, C. R. F. Análise quantitativa por cromatografia. Campinas, 2003. Disponível em: <www.chemkeys.com>. Acesso em 20 de abril 2006.

AVRAMIDES, E. J. Long-term stability of pure standards and stock standard solutions for the determination of pesticide residues using gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1080, p.166-176, 2005.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2. ed. 2002. p. 313-400.

BANERJEE, K. et al. Optimization of separation and detection conditions for the multiresidue analysis of pesticides in grapes by comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, p. 350–357, 2008.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004. p. 23-106.

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

BEENS, J. *et al.* Moving Cryogenic Modulator for the Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography (GC×GC) of Surface Water Contaminants. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 13, p. 134-140, 2001.

BIZIUK, M. *et al.* Occurrence and determination of pesticides in natural and treated waters. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 103-123, 1996.

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: <

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm >. Acesso em 17 de janeiro de 2008.

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 23 de janeiro de 2008.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Ficha de Informação de produto químico, 2008. Disponível em http://www.cetesb.sp.gov.br/Emergencia/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=ACETONA.

CHEN *et al.* Determination of organochlorine pesticide residues in rice and human and fish fat by simplified two-dimensional gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1315–1319, 2007.

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.

COCHRAN, J. Evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography – time-of-flight mass spectrometry for the determination of pesticides in tobacco. **Journal of Chromatography A**, v. 1186, p. 202–210, 2008,

CODEX ALIMENTARIUS. Pesticide Residues in Food, 2008. Disponível em <http://www.codexalimentarius.net/mrls/servlet/PesticideServlet?Pesticides=0&Items=358&out_style=by+substance&Domain=PesticideMRLs&Language=english&query_form=%2Fmrls%2Fpestdes%2Fpest_q-e.htm>. Acesso em 25 de fevereiro de 2008.

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.

DALLÜGE, J. *et al.*; Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-offlight mass spectrometric detection applied to the determination of pesticides in food extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 965, p. 207-217, 2002.

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). Cultivo de tomate para industrialização, 2003. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial/autores.htm>><<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial/autores.htm>>. Acesso em 12 de fevereiro de 2008.

ENGINDENIZ, S. Economic analysis of pesticide use on processing tomato growing: A case study of Turkey. **Crop Protection**, v. 25, p. 534 – 541, 2006.

EPA (Environmental Protection Agency). About Pesticides, 2008a. Disponível em <http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>. Acesso em 17 de janeiro de 2008.

EPA (Environmental Protection Agency). Acetonitrile, 2000. Disponível em: <<http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/acetonit.html>>. Acesso em 10 de abril de 2008.

EPA (Environmental Protection Agency). Assessing approaches for the development of PBPK models of pyrethroid pesticides, 2007. Disponível em: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2007/august/pyrethroidpbpk_sap_2007_finalv1.pdf>. Acesso em 24 de janeiro de 2008.

EPA (United States Environmental Protection Agency). Permethrin, Resmethrin, Sumithrin: synthetic pyrethroids for mosquito control, 2008b. Disponível em <<http://www.epa.gov/pesticides/health/mosquitoes/pyrethroids4mosquitoes.htm>>. Acesso em 24 de janeiro de 2008.

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 de janeiro de 2007.

FIGUEIRA, F. A. R. **Manual de olericultura. Cultura e comercialização de hortaliças**. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda, v. 2, p. 223 – 234, 1982.

FRIGGI, C. **Avaliação de um modulador a ar comprimido para GC×GC e sua aplicação para determinação de resíduos de pesticidas piretróides em uva**, 2007. 107 f. Dissertação (Mestrado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

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

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

GÓRECKI, T.; PANIC, O.; OLDRIDGE, N.; **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**. v. 29, p. 1077-1104, 2006.

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

HERCEGOVÁ, A.; DÖMÖRÖVÁ, M.; MATISOVÁ, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticides residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 54-73, 2007.

HERNANDEZ, F. *et al.* Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, p. 1242, 2006.

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.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), Informe Conjuntural, 2007.

Disponível em

<<http://cepa.epagri.sc.gov.br/Infconj/textos07/ITomate/ITomate0607.htm>>. Acesso em 12 de fevereiro de 2008.

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

JORGENSON, J. L. Aldrin and Dieldrin: A Review of Research on Their Production, Environmental Deposition and Fate, Bioaccumulation, Toxicology, and Epidemiology in the United States. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 113-139, 2001.

KOK, A. de; HIEMSTRA, M.; VREEKER, C. P. Improved cleanup method for the multiresidue analysis of N-methylcarbamates in grains, fruits and vegetables by means of HPLC with post-column reaction and fluorescence detection. **Chromatographia**, v. 24, p. 469-476, 1987.

KOMATSU, E.; VAZ, J. M. Otimização dos parâmetros de extração para determinação de pesticidas em amostras de água empregando microextração em fase sólida. **Química Nova**, v. 27, p. 720-724, 2004.

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.

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.

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.

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, p. 21-29, 1999.

LEANDRO, C. C. *et al.* Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, p. 94–101, 2006.

LEHOTAY, S. Analysis of pesticides residues in mixed fruit and vegetable extracts by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry, **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 83, p. 680-697, 2000.

LEHOTAY, S. Determination of pesticide residues in nonfatty foods by supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 85, n.5, p. 1148-1166, 2002.

LEHOTAY, S. Determination of pesticides residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study, **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 90, p. 485-520, 2007.

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, 2005a.

LEHOTAY, S. J. Evaluation of two fast and easy methods for residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 88, p. 630-638, 2005.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 88, p. 615-629, 2005b.

LINDERS, J.B.J.H *et al.* Pesticides: Benefaction or Pandora's Box? A synopsis of the environmental aspects of 243 pesticides. **National institute of public health and environmental protection**. Report n° 679101014, 1994.

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, p. 1020-1026, 1975.

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.

MILLS, P. A.; ONLEY, J. J.; GAITHER, R. A. **Association of Official Agricultural Chemists**. v. 46, p. 186, 1963.

MINAMI, K.; HAAG, H. P. **O tomateiro**. São Paulo: Fundação Cargill, 1989. p. 1-17.

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

PHILLIPS, J.; BEENS, J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a hyphenated method with strong coupling between the two dimensions. **Journal of Chromatography A**, v. 85, p. 331–347, 1999.

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

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

PINTO, G. M. F.; PINTO, J. F.; FILHO, R. M. Avaliação de contaminação ambiental causada por poluentes orgânicos persistentes utilizando simulação computacional. **Química Nova**, v. 30, p. 565-568, 2007.

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.

QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe). Mini-multiresidue method for the analysis of pesticides, 2006. Disponível em <<http://www.quechers.com>>. Acesso em 25 de fevereiro de 2008.

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

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. **Introdução à Química Ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2004, p. 119.

RODRIGUEZ R., MAÑES, J., PICÓ, Y. Off-Line solid-phase microextraction and capillary electrophoresis mass spectrometry to determine acidic pesticides in fruits. **Analytical Chemistry**, v.75, p. 452-459, 2003.

RYAN, D.; MARRIOT, P. Comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, p. 295-297, 2003.

SAITO, Y. *et al.* Multiresidue Determination of Pesticides in Agricultural Products by Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Large Volume Injection. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.87, n° 6, p. 1356 - 1367, 2004.

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.

SCHENCK, F. J. *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, n° 5, p. 1177-1180, 2002.

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

SCHUREK, J. Application of head-space solid-phase microextraction coupled to comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry for the determination of multiple pesticide residues in tea samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 611, p. 163–172, 2008.

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.

SMITH, R. M. Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 3-27, 2003.

TAVARES, C. A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoid composition of Brazilian Tomatoes and tomato products. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 27, p. 219 – 224, 1994.

TONON, R. V.; BARONI, A. F.; HUBINGER, M. D. Estudo da Desidratação Osmótica de Tomate em Soluções Ternárias pela Metodologia de Superfície de Resposta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 715-723, 2006.

UNIÃO EUROPÉIA, Plant Protection – Pesticide Residues, 2008. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/index_en.htm. Acesso em 23 de abril de 2008.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, p. 390-400, 2003.

ZROSTLÍKOVÁ, J. *et al.* Evaluation of two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry for the determination of multiple pesticide residues in fruit. **Journal of Chromatography A**, v. 1019 173–186, 2003.

ZROSTLÍKOVÁ, J.; HAJŠLOVÁ, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v.1000, p.181-197, 2003.