

Universidade Federal de Sergipe
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Núcleo de Pós-Graduação em Química

ADALBERTO MENEZES FILHO

**DESENVOLVIMENTO, APLICAÇÃO DE METODOLOGIA
PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS
EM TOMATE POR DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE
SÓLIDA (MSPD) E CROMATOLOGRAFIA GASOSA
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS)**

SÃO CRISTÓVÃO
Abril – 2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**DESENVOLVIMENTO, APLICAÇÃO DE METODOLOGIA
PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS
EM TOMATE POR DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE
SÓLIDA (MSPD) E CROMATOGRÁFIA GASOSA
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS)**

ADALBERTO MENEZES FILHO

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

ORIENTADOR: Prof: Dr. Haroldo Silveira Dórea

SÃO CRISTÓVÃO
Abril – 2005

À minha esposa Edijane, namorada e companheira em todos os momentos, dedicada a família e meu ponto de apoio nos momentos mais difíceis e aos meus filhos Allan e Alana, fonte de inspiração para realização de novos sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força e saúde para vencer mais uma batalha com determinação e satisfação pelo trabalho realizado.

Agradeço de forma bastante especial ao professor Haroldo S. Dórea, uma pessoa amiga e competente que me transmite segurança, por ter acreditado no meu potencial e que está sempre procurando me incentivar para a realização de novos projetos, estando sempre disponível para passar sua experiência e os seus conhecimentos.

Ao amigo e companheiro Sandro Navickiene, um profissional de grande potencial que me deu um grande suporte na realização deste trabalho, disponibilizando materiais e estando sempre disponível para qualquer tipo de ajuda necessária.

Aos professores Jailson Bittencourt de Andrade e Pedro Afonso Pereira do Instituto de Química da UFBA, por disponibilizar o seu laboratório para a conclusão deste trabalho.

Ao professor Antônio Wilson pela orientação na elaboração do projeto na seleção do mestrado e à professora Regivânia Franco pela flexibilidade no horário de trabalho no CEFET, para realizar os estudos do mestrado.

À professora Maria Auxiliadora e ao Carlinhos da direção do COC-Colégio São Paulo pela flexibilidade no horário sempre que necessário para realização dos trabalhos do mestrado, e aos professores Robério, Anselmo, Jairo, Wellington, Sheila, Simone, Eulina, Liége que me substituíram quando necessário.

Aos colegas de laboratório Bruno, Waneide, Ricardo, Larissa e Alain que proporcionaram um ambiente de trabalho saudável e sempre estiveram disponíveis para compartilhar seus conhecimentos.

Aos colegas do LPQ da UFBA, Joyce e Frederico (Fred), pelo apoio prestado durante a realização dos trabalhos na UFBA.

Aos colegas da turma do mestrado (Robson, Jeremias, Silvanito e Elisângela) pelo companheirismo durante todo o curso de mestrado.

CURRICULUM VITAE

Nome: Adalberto Menezes Filho

Filiação: Adalberto Menezes de Souza e Maria dos Santos Souza

Endereço: Rua Distrito Federal nº 1015, Siqueira Campos Telefone: 3241-4943
Aracaju-SE

Identidade: 1097765-1 Data de expedição: 07/03/1996

Data de nascimento: 02/06/1968 Naturalidade: Itabi - SE

Estado civil: Casado Cônjuge: Edijane Melo Menezes

FORMAÇÃO

Pós-Graduação: Universidade Federal de Sergipe

Curso: Química de Alimentos Ano de conclusão: 1999

Graduação: Universidade Federal de Sergipe

Curso: Licenciatura em Química Ano de conclusão: 1992

Ensino médio: Escola Técnica Federal de Sergipe

Curso: Técnico em Química Ano de conclusão: 1987

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Empresa: COC – Colégio São Paulo

Profissão: Professor do ensino médio

Admissão: 14/04/1994

Empresa: Centro Federal de Educação Tecnológica de Sergipe (CEFET)

Profissão: Professor do ensino médio

Admissão: 29/09/1995

ATIVIDADE DESENVOLVIDA NO MESTRADO

Trabalho aceito para a apresentação na forma de pôster na 28ª Reunião Anual da SBQ com o título: Determinação multirresíduo de pesticidas em tomate por dispersão da matriz em fase sólida e análise por GC-MS, a ocorrer de 30/05 a 02/06 de 2005 em Poços de Caldas, MG.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| LISTA DE FIGURAS..... | I |
| LISTA DE TABELAS..... | III |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | V |
| RESUMO..... | VI |
| ABSTRACT..... | VII |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. OBJETIVOS..... | 5 |
| 2.1. Objetivo geral..... | 5 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 5 |
| 3. JUSTIFICATIVA..... | 6 |
| 4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 8 |
| 4.1. Pesticidas..... | 8 |
| 4.1.1. Classificação e consumo..... | 8 |
| 4.1.2. Estrutura e atividade dos pesticidas..... | 16 |
| 4.1.2.1. Organofosforados..... | 16 |
| 4.1.2.2. Piretróides..... | 17 |
| 4.1.2.3. Azol..... | 18 |
| 4.1.3. Aspectos toxicológicos dos pesticidas | 20 |
| 4.2. A cultura do tomate e a produção brasileira..... | 23 |
| 4.3. Dispersão da matriz em fase sólida..... | 28 |
| 4.4. Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas..... | 35 |
| 5. REVISÃO DA LITERATURA..... | 40 |
| 6. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 47 |
| 6.1. Materiais..... | 47 |
| 6.2. Reagentes e adsorventes..... | 47 |
| 6.3. Padrões e soluções..... | 47 |
| 6.4. Limpeza dos materiais..... | 48 |
| 6.5. Condições cromatográficas de análise por GC-MS..... | 48 |
| 6.6. Processo da dispersão da matriz em fase sólida..... | 49 |

| | |
|---|----|
| 6.6.1. Preparação da amostra..... | 49 |
| 6.6.2. Método de extração por MSPD | 50 |
| 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 54 |
| 7.1. Otimização das condições cromatográficas..... | 54 |
| 7.2. Seleção do eluente..... | 56 |
| 7.3. Seleção do adsorvente (Suporte)..... | 60 |
| 7.4. Efeito da matriz..... | 62 |
| 7.5. Escolha da proporção matriz/adsorvente..... | 64 |
| 7.6. Limpeza do extrato com uma co-coluna (clean-up)..... | 66 |
| 7.7. Preparação da curva analítica..... | 70 |
| 7.8. Estudo de recuperação e repetitividade do método..... | 75 |
| 7.9. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)..... | 79 |
| 7.10. Linearidade..... | 81 |
| 7.11. Aplicação da metodologia desenvolvida: análise de amostras comerciais de tomate..... | 83 |
| 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 85 |
| 9. PERSPECTIVAS FUTURAS..... | 86 |
| 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 87 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1- Comparação do consumo de pesticidas em kg/ha em alguns países. | 12 |
| FIGURA 2 – Defensivos agrícolas em linha de comercialização por ingredientes ativos..... | 14 |
| FIGURA 3 – Pesticidas em linha de comercialização por classes toxicológicas.... | 15 |
| FIGURA 4: Estrutura geral dos ésteres organofosforados..... | 16 |
| FIGURA 5: Estrutura geral dos piretróides..... | 18 |
| FIGURA 6 – Mecanismo de decomposição da acetilcolina (Ach) em colina e ácido acético catalisada pela enzima acetilcolinesterase (AchE)..... | 22 |
| FIGURA 7: Esquema de montagem da coluna MSPD para extração de pesticidas em tomate..... | 51 |
| FIGURA 8: Procedimento para a extração de pesticidas por dispersão da matriz em fase sólida de amostras de tomate..... | 52 |
| FIGURA 9: Cromatograma obtido por GC-MS (modo SIM) de solução cumulativa de pesticidas com concentração de $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ | 56 |
| FIGURA 10: Cromatograma obtido por GC-MS (SIM) de um extrato de tomate fortificado, obtido através de extração realizada com C_{18} e diclorometano. | 59 |
| FIGURA 11: Cromatograma obtido por GC-MS (SIM) de um extrato de tomate fortificado, obtido através de extração realizada com C_{18} e acetato de etila. | 60 |
| FIGURA 12: Comparação entre as curvas analíticas da solução padrão de cipermetrina (cis) preparada no solvente puro (diclorometano) e no extrato da matriz de tomate..... | 64 |
| FIGURA 13: Teste para a escolha da proporção matriz/adsorvente tendo DCM como solvente de eluição e alumina como suporte..... | 65 |
| FIGURA 14: Cromatograma obtido por GC-MS (modo SIM) com extrato obtido utilizando Florisil como adsorvente e alumina neutra como co-coluna..... | 69 |
| FIGURA 15: Cromatograma obtido por GC-MS (modo SIM) com extrato obtido utilizando alumina neutra como adsorvente e Florisil como co-coluna..... | 70 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 16 – Curva analítica do dimetoato por GC/MS..... | 72 |
| FIGURA 17 – Curva analítica da parationa metílica por GC/MS..... | 73 |
| FIGURA 18 – Curva analítica da malationa por GC/MS..... | 73 |
| FIGURA 19 – Curva analítica do tebuconazol por GC/MS..... | 74 |
| FIGURA 20 – Curva analítica da cipermetrina (cis) por GC/MS..... | 74 |
| FIGURA 21 – Cromatograma obtido por GC/MS da amostra de tomate fortificada por MSPD com os pesticidas: 1. dimetoato (250 ng.g^{-1}); 2. parationa metílica (100 ng.g^{-1}); 3. malationa (250 ng.g^{-1}); 4. tebuconazol (50 ng.g^{-1}) e 5. cipermetrina-cis (50 ng.g^{-1})..... | 78 |
| FIGURA 22 – Cromatograma obtido por GC/MS da amostra de tomate fortificada por MSPD com os pesticidas : 1. dimetoato ($1,0 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$); 2. parationa metílica ($0,5 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$); 3. malationa ($3,0 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$); 4. tebuconazol ($0,1 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$) e 5. cipermetrina-cis ($0,1 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$)..... | 78 |
| FIGURA 23 – Cromatograma obtido por GC/MS da amostra de tomate fortificadas por MSPD com os pesticidas: 1. dimetoato ($2,0 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$); 2. parationa metílica ($1,0 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$); 3. malationa ($4,0 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$); 4. tebuconazol ($0,5 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$) e 5. cipermetrina-cis ($0,5 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$). | 79 |
| FIGURA 24 – Cromatograma do branco da amostra de tomate obtido por GC-MS (modo SIM). | 81 |
| FIGURA 25 – Faixa linear de trabalho da malationa obtido por GC-MS..... | 83 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1: Classificação dos pesticidas selecionados para estudo..... | 11 |
| TABELA 2: Distribuição do consumo de pesticidas no Brasil por estados (1999)..... | 13 |
| TABELA 3: Pesticidas selecionados para o presente estudo..... | 19 |
| TABELA 4: Propriedades físico-químicas dos pesticidas estudados | 20 |
| TABELA 5: Consumo de pesticidas em algumas culturas agrícolas no Brasil, em quantidade de ingrediente ativo..... | 26 |
| TABELA 6: Consumo de pesticidas por unidade de área em algumas culturas agrícolas no Brasil, em quantidade de ingrediente ativo..... | 27 |
| TABELA 7: Características dos pesticidas selecionados para este estudo..... | 28 |
| TABELA 8: Adsorventes mais empregados na extração MSPD..... | 30 |
| TABELA 9: Fragmentos monitorados na quantificação dos pesticidas..... | 55 |
| TABELA 10: Teste para escolha do solvente de eluição tendo o C ₁₈ como adsorvente..... | 57 |
| TABELA 11: Teste para escolha do solvente de eluição tendo Florisil como adsorvente..... | 58 |
| TABELA 12: Teste para escolha do adsorvente (suporte) para extração por MSPD tendo DCM como solvente de eluição..... | 61 |
| TABELA 13: Teste utilizando a co-coluna MSPD tendo DCM como solvente de eluição e alumina como suporte..... | 67 |
| TABELA 14: Recuperações dos analitos sem e com o clean-up..... | 68 |
| TABELA 15: Curva analítica por regressão linear para os pesticidas preparados no extrato da matriz e analisados por MSPD, GC-MS modelo QP5010 (UFS)..... | 71 |
| TABELA 16: Curva analítica por regressão linear para os pesticidas preparados no extrato da matriz e analisados por MSPD, GC-MS modelo QP2010 (UFBA).... | 72 |
| TABELA 17: Resultados de recuperação (n =7) com intervalo de confiança e estimativa de desvio padrão relativo em 3 níveis de fortificação. | 76 |

| | |
|--|----|
| TABELA 18: Limites de detecção e limites de quantificação dos pesticidas em estudo na metodologia analítica desenvolvida..... | 80 |
| TABELA 19: Intervalos da faixa de trabalho de cada pesticida..... | 82 |
| TABELA 20: Resultado das amostras comerciais de tomate (n = 3)..... | 84 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- AChE** – Acetilcolinesterase
- ACh** – Acetilcolina
- AcOEt** – Acetato de etila
- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CGC** – Cromatografia gasosa capilar
- DAD** – Detector com arranjo de diodo
- DCM** – Diclorometano
- DPR** – Desvio padrão relativo
- ECD** – Detector de captura de elétrons (*Electron-Capture Detector*)
- EP** – Farmacopéia européia (*European Pharmacopoeia*)
- GC** – Cromatografia gasosa (*Gas Chromatography*)
- HPLC** – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)
- IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IDA** – Índice Diário aceitável
- LLE** – Extração líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction*)
- LMR** – Limite máximo de resíduos
- LOD** – Limite de detecção (*Limit of Detection*)
- LOQ** – Limite de quantificação (*Limit of Quantitation*)
- MS** – Espectrometria de massas (*Mass Spectrometric*)
- MSD** – Detector de espectrometria de massas (*Mass Spectrometric Detector*)
- MSPD** – Dispersão da matriz em fase sólida (*Matrix Solid-Phase Dispersion*)
- NPD** – Detector de nitrogênio e fósforo (*Nitrogen-Phosphorus Detector*)
- OCP** – Pesticidas organo-clorados (*Organochlorine Pesticides*)
- OPP** – Pesticidas organo-fosforados (*Organophosphorus pesticides*)
- SPI** – Inseticidas piretróides sintéticos (*Synthetic Pyrethoid Insecticide*)
- SPE** – Extração em fase sólida (*Solid-Phase Extraction*)
- SFE** – Extração com fluido supercrítico (*Supercritical Fluid Extraction*)
- SPME** – Micro-extração em fase sólida (*Solid-Phase Micro-Extraction*)

RESUMO

A presença de resíduos de pesticidas em alimentos constitui um grande risco a saúde da população, tornando-se necessário o estudo de metodologias analíticas para análises multirresíduos de pesticidas. Foi desenvolvido um procedimento baseado na dispersão da matriz em fase sólida para a extração dos pesticidas dimetoato, parationa metílica, malationa, tebuconazol e cipermetrina (cis), avaliando-se diferentes parâmetros experimentais, tais como: seleção do solvente para eluição, escolha do adsorvente, do volume de solvente para eluição e da proporção amostra/adsorvente foram otimizados para a extração dos princípios ativos selecionados da matriz de tomate. Experimentos de recuperação foram realizados com amostras de tomate fortificadas com os pesticidas. Os extratos foram analisados por GC-MS utilizando coluna capilar DB-5, injeção no modo splitless e operando no modo SIM, selecionando dois ou três íons de cada pesticida. O solvente apropriado foi o diclorometano, devido à limpeza do extrato final e aos valores de recuperação obtidos. Resultados experimentais demonstram que 20 mL de diclorometano é suficiente para a extração dos pesticidas no tomate. Extrações com diferentes adsorventes evidenciaram que alumina neutra na proporção de 4:1 (m:m) é a mais adequada. A combinação alumina + Florisil apresentou extratos mais limpos. Os valores de recuperação obtidos variaram de $77,3 \pm 9,2$ a $100,1 \pm 18,5$ para os pesticidas selecionados, com limites de quantificação de 0,031 a $0,060 \text{ mg.kg}^{-1}$. A quantificação foi efetuada pelo método do padrão externo ($0,1\text{--}2,0 \text{ mg.kg}^{-1}$) As amostras comerciais de tomate apresentaram resíduos dos pesticidas dimetoato, parationa metílica e malationa.

PALAVRAS CHAVE: *Pesticidas, tomate, MSPD*

ABSTRACT

A simple extraction method based on matrix solid-phase dispersion (MSPD) was developed for the determination of methamidophos, dimethoate, methyl parathion, malathion, tebuconazole and cypermethrin in tomato using gas chromatography-mass spectrometry and selected ion monitoring (GC-MS, SIM). Different parameters of the method were optimized, such as type of solid phase used, the amount of solid phase and eluent. The experimental results show that the combination of alumina-Neutral (4:1) and 20 mL of dichloromethane makes this extraction column suitable for a complex matrix such as tomato. Besides, cleanest extracts are obtained using alumina-Neutral + florisil. The method was validated with fortified tomato samples at different concentration levels (0.10 - 2.0 mg/kg). Average recoveries ranged from 77.3% to 100.1% with relative standard deviation between 9.2% and 18.5%. The pesticide residues were quantified by using the external standard method. Quantification limits ranged from 0.03 to 0.06 mg/kg for the tomato. Commercial samples of tomato were analysed and residues of dimethoate, methyl-parathion and malathion were found at levels below the MRLs.

KEYWORDS: *pesticides, tomato, MSPD*

1. INTRODUÇÃO

Foram nas três primeiras décadas do século XX que se deu à difusão mundial da primeira geração dos inseticidas, a dos produtos inorgânicos, botânicos e organo-minerais (DÓREA, 2000). A entrada definitiva dos pesticidas no dia-a-dia do homem e conseqüentemente no meio ambiente foi a partir das décadas de 40 e 70 com o pacote tecnológico da Revolução Verde¹ (PINHEIRO, 2004). Porém no Brasil, foi na década de 70 que houve a grande expansão na produção e no uso de pesticidas, em razão dos incentivos para a produção agrícola e a política de exportação (DÓREA, 1999).

Os pesticidas de maneira geral são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, destinadas a matar, controlar ou combater as pragas, tudo aquilo que ataca, lesa ou transmite enfermidades às plantas, aos animais e ao homem (DÓREA, 1999). Estes produtos foram desenvolvidos no decorrer dos últimos cem anos com a finalidade de proteger o homem contra organismos nocivos (FELLENBERG, 1980).

O continuo crescimento da população mundial, a qual está estimada em 6,2 bilhões de habitantes, induz a preocupação com a quantidade de alimentos que deverão ser produzidos nas próximas safras. Estima-se que 30 a 40% dos alimentos que poderiam ser potencialmente produzidos são perdidos anualmente por ataques de pragas e doenças, atingindo impressionantes US\$ 300 bilhões em perdas (BASTOS, 2004).

A melhoria no rendimento da produção agrícola não requer apenas o uso adequado de fertilizantes; exige também um controle rigoroso de pragas, tais como: insetos, fungos e ervas daninhas. Para tanto, dispõe-se de uma grande quantidade de princípios ativos que isolados ou em mistura, que é obtida combinando-se dois ou mais princípios ativos diferentes, constituindo um grande número de formulações que são empregadas como:

¹ Pacote composto de um conjunto de práticas e insumos agrícolas necessários para assegurar níveis crescentes de produtividade (PINHEIRO, 2004)

inseticidas, fungicidas, herbicidas, etc. O uso dos pesticidas permitiu a um considerável aumento na produção agrícola por combater e evitar a proliferação de pragas. Porém, o uso incorreto acarreta grandes problemas ao ambiente, contaminando solos, rios, lençóis freáticos e a atmosfera. Atingindo assim, de forma direta ou indireta a saúde do ser humano, seja pelo contato direto com os pesticidas durante a fabricação, aplicação em culturas agrícolas e pastagens, no armazenamento, na limpeza dos utensílios utilizados na preparação e aplicações, na eliminação das sobras após aplicações ou de forma indireta através do consumo de alimentos que apresentam resíduos acima dos valores permitidos pela legislação ou pela ingestão de água contaminada por estes produtos.

Nos alimentos, a presença dos pesticidas pode advir da aplicação direta em uma das fases da produção, no transporte ou no armazenamento dos gêneros alimentícios. A persistência de algumas classes de pesticidas, os transformam em contaminantes encontrados em ambientes terrestres e aquáticos por muitos anos, como os organoclorados (ARAÚJO, 1999). Os agricultores devem respeitar o prazo de carência que existe para cada princípio ativo nos diversos produtos comercializados. Cada princípio ativo possui um tempo de meia-vida para se degradar ou ser metabolizado. Se este período não for respeitado o alimento pode chegar ao consumidor contaminado. Estas quantidades remanescentes de pesticidas nos alimentos são denominadas de resíduos de pesticidas (SOBRINHO, 2003).

È inegável a importância desses produtos na economia mundial, tendo em vista o contínuo crescimento da população, garantindo a produção de grandes quantidades de alimentos (SOBRINHO, 2003). Porém a relação risco-benefício deve ser devidamente avaliada, priorizando a escolha de produtos com menor grau de toxidez durante a escolha de um produto que será aplicado em uma determinada cultura.

Em princípio, qualquer forma de aplicação de pesticidas é sempre acompanhada do perigo de absorção ou ingestão dos mesmos pelo homem ou pelos animais, em função da involuntária propagação dos pesticidas pelo ambiente. Ao serem absorvidos ou ingeridos pelo homem, os pesticidas

tornam-se problemáticos, principalmente nos casos em que não são eliminados rapidamente após a ingestão, ocorrendo o acúmulo no organismo. Este perigo é maior com os pesticidas facilmente solúveis em gorduras (pesticidas lipofílicos). No homem e nos animais estas substâncias se acumulam principalmente nos tecidos nervosos e nas gorduras. Como o tecido adiposo (gorduroso) não contém enzimas, é neste local que os pesticidas se mantêm por mais tempo no organismo. Estas substâncias se acumulam até atingirem uma concentração várias vezes maiores que a existente no ambiente (ar, água, vegetais) (FELLENBERG, 1980).

Os alimentos que são consumidos pelo homem na forma *in natura*, principalmente aqueles que são consumidos com a casca, constituem uma das principais formas de contaminação indireta e involuntária de pesticidas pelo homem. A presença de resíduos em frutas e vegetais pode ser uma das principais rotas de exposição do homem a estes compostos (NAVARRO, 2002). Por este motivo foram estabelecidos limites máximos de resíduos² (LMR), os quais são estabelecidos através de dados toxicológicos e da ingestão diária aceitável³ (IDA) em alimentos para assegurar que os níveis de resíduos não causem risco à saúde da população.

O tomate é um fruto muito utilizado pelo homem, podendo ser consumido *in natura* ou sob a forma de diversos produtos industrializados, tais como: extrato de tomate, polpa, molho, suco e catchup. No Brasil, 60% da produção é destinado ao consumo *in natura*, denominado de tomate tipo “mesa” e os outros 40% são destinados ao processamento nas indústrias (AZEVEDO, 2004). Por ser um fruto muito susceptível ao ataque de doenças provocadas por insetos e fungos, no decorrer do período de cultivo este fruto recebe aplicações periódicas de pesticidas, que se não forem aplicados de forma correta, respeitando as dosagens e os períodos de

² O Limite Máximo de Resíduo é definido como a concentração máxima de resíduos de um pesticida para que se permita legalmente seu uso na superfície ou na parte interna de produtos alimentícios para consumo humano e de animais (FAO/OMS, 1994)

³ IDA – Dose diária que ingerida durante toda vida, parece não apresentar riscos apreciáveis para a saúde do consumidor, à luz dos conhecimentos atuais na avaliação de uma substância química (FAO/OMS, 1994).

carência pode apresentar um nível de resíduos acima do permitido pela legislação.

As metodologias analíticas clássicas, como a extração líquido-líquido (LLE) consomem muito tempo na análise e requer grandes quantidades de solventes orgânicos e reagentes químicos, acarretando em custos e problemas no descarte dos materiais utilizados.

Uma das técnicas utilizadas para extração de resíduos de pesticidas é denominada dispersão da matriz em fase sólida (*Matrix Solid-Phase Dispersion* – MSPD) que foi desenvolvida e empregada pela primeira vez em 1989 por Barker e colaboradores, com o intuito de isolar resíduos de drogas em tecidos animais (BARKER, 1998). Esta técnica foi introduzida no Brasil em 1998 por Dórea e Lanças (DÓREA, 2000) para análise de resíduos de pesticidas em frutos tropicais e que tem apresentado vantagens em comparação com outras técnicas, como extração líquido-líquido e extração em fase sólida, por apresentar um menor consumo de solventes orgânicos e ser de execução mais rápida. Diante do que foi exposto, observa-se a necessidade de desenvolver metodologias analíticas, utilizando técnicas de extração mais simples e eficientes na determinação de resíduos de pesticidas em alimentos.

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia analítica para a determinação de resíduos de pesticidas em tomate, visando o monitoramento de resíduos dos pesticidas dimetoato, parationa metílica, malationa, tebuconazol e cipermetrina (cis) em tomates comercializados na cidade de Aracaju.

2.2- Objetivos Específicos

- Identificar e selecionar os pesticidas utilizados na produção do tomate;
- Desenvolver um procedimento analítico para extrair resíduos dos pesticidas selecionados utilizando a técnica de extração por dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) da matriz de tomate;
- Obter as condições cromatográficas para análise dos pesticidas selecionados por GC-MS;
- Validar o método desenvolvido por MSPD e GC-MS;
- Aplicar o método desenvolvido em amostras de tomate comercializados em Aracaju/SE.

3. JUSTIFICATIVA

Com o crescente aumento da população mundial, torna-se necessário aumentar a produção de alimentos. Além do desenvolvimento de novas técnicas agrícolas e da mecanização das lavouras, a utilização dos pesticidas de forma racional no combate a pragas nas diversas culturas agrícolas é uma necessidade para atender a esta crescente demanda de alimentos. Os pesticidas têm sido utilizados para combater pragas e ervas daninhas que atacam as culturas, bem como os alimentos armazenados. Com esta finalidade, o uso de pesticidas na agricultura é oficialmente permitido pelos órgãos governamentais, após registro de suas formulações para as diversas culturas nas quais serão utilizados (BARRETTO et al,1996).

A utilização racional dos pesticidas, associada com as boas práticas agrícolas, requer um bom nível de esclarecimento das pessoas envolvidas diretamente ou indiretamente na utilização destes produtos nas diversas culturas agrícolas, sobre toda a problemática em questão. Quando estes produtos são utilizados de forma excessiva ou de maneira inadequada, não sendo respeitada a dosagem correta do pesticida para o tipo de cultura em que será aplicado, o intervalo mínimo para aplicações ou o tempo de carência necessário para a comercialização dos alimentos, pode acarretar a contaminação de cereais, legumes e vegetais, através dos pesticidas aplicados. As contaminações podem ocorrer pelos próprios princípios ativos ou pelos seus metabólitos originados nas decomposições daqueles. Em alguns casos, esses metabólitos possuem um nível de toxicidade maior que o próprio princípio ativo, tendo como consequência o comprometimento da saúde do homem e a contaminação do meio ambiente.

O monitoramento da quantidade de resíduos presentes nos alimentos é muito importante para avaliar a qualidade dos alimentos, proporcionando verificações de tendências no aumento do uso e de caracterização da fonte de contaminação. Para isto é necessário o desenvolvimento de novas metodologias analíticas para as diversas matrizes, que sejam confiáveis, rápidas e apresentem baixo custo de execução, favorecendo a relação

custo/benefício que facilitará a sua difusão e aplicação nos laboratórios que trabalham com análises de rotina.

A técnica de extração por dispersão da matriz em fase sólida mostra ser uma técnica atrativa por apresentar os pré-requisitos descritos anteriormente para o desenvolvimento de uma metodologia analítica.

A cromatografia possui grande aplicação na análise química, podendo ser utilizada na análise de diversas substâncias. A utilização da cromatografia gasosa acoplada com a espectrometria de massas é descrita na literatura para determinação de resíduos de pesticidas em diversas matrizes. Uma metodologia analítica utilizando uma técnica de extração que atenda os pré-requisitos já descritos, associada com a cromatografia gasosa acoplada com a espectrometria de massas apresenta a vantagem de poder quantificar e confirmar o tipo de analito que está sendo analisado, aumentando a confiabilidade da metodologia analítica.

O tomate é um fruto utilizado diariamente na alimentação dos brasileiros. Por ser muito susceptível ao ataque de insetos e fungos, esta hortaliça recebe periodicamente um tratamento químico a base de pesticidas para o combate de pragas. Quando é consumido na forma *in natura*, constitui uma possível e perigosa rota indireta de contato da população com estes contaminantes.

No Estado de Sergipe já foram realizados alguns estudos sobre resíduos de pesticidas em água e suas influências na saúde do trabalhador rural (PINHEIRO, 2004), em arroz (SOBRINHO e DÓREA, 2004), em acerola (PINHEIRO e DÓREA, 2003), em quiabo (DÓREA e LOPES, 2004), em feijão (LOPES e DÓREA, 2003). Como o Estado de Sergipe é proporcionalmente um dos estados do Nordeste com maior área irrigada (PINHEIRO, 2004), tornam-se necessários estudos mais detalhados e diversificados que forneçam subsídios para uma avaliação e o monitoramento dos níveis de resíduos de pesticidas em alimentos aqui produzidos e comercializados, para que haja um maior controle ambiental e da qualidade dos alimentos que chega a população.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 – Pesticidas

4.1.1 – Classificação e consumo

A palavra pesticida vem do inglês *pesticide*, e expressa a eliminação de “pestes” ou “pragas” (NAKANO, 1999). No ano de 1872 o químico Ottmar Zeidler sintetizou, na Universidade de Estrasburgo, a substância diclorodifenil-tricloroetano (DDT). Mais tarde, o químico Paul Müller verificou que esta substância tem forte ação inseticida (FELLENBERG, 1980). O DDT foi muito usado em programas de saúde pública (no combate da malária, tifo, febre amarela e outras doenças infecciosas). O alemão Michaelis e o russo Arbusov, em 1897, foram os primeiros a trabalhar com os clássicos ésteres contendo fósforo (ETO, 1977).

Embora um grande número de compostos organofosforados tenha sido descoberto no início do século, os conhecimentos dos seus efeitos deletérios só foram relatados em 1932. A descoberta resultou em um grande número de novos usos para os compostos organofosforados, incluindo o seu uso como gases neurotóxicos, chamados de “*gases dos nervos*”, os conhecidos gases de guerra *sarin*, *soman* e *tabun*, que foram usados na II Guerra Mundial (MORAES, 2004).

A primeira geração de pesticidas foi difundida nas três primeiras décadas do século XX. Em 1939, constituindo a segunda geração de pesticidas surgem os produtos organo-sintéticos, tais como os organofosforados, carbamatos, ditiocarbamatos e piretróides. Os compostos que constituem a terceira geração começaram a surgir nos anos sessenta com os semioquímicos, imidazóis, triazóis e os fungicidas sistêmicos. A quarta geração surge com os hormônios juvenis e os inibidores de síntese de quitina. A quinta geração é formada pelos vegetais, como os precocenos e os microorganismos (DÓREA, 1999).

Os organoclorados (OCP) foram até 1957 os compostos mais usados como pesticidas. Entretanto, a partir deste ano, levando-se em consideração

a persistência ambiental dos organoclorados, o reconhecido potencial inseticida e a menor persistência ambiental dos organofosforados (OPP), os organoclorados foram sendo substituídos pelos organofosforados e posteriormente, em parte pelos carbamatos (MORAES, 1999).

De acordo com o Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7802/1989, os defensivos agrícolas, ou agrotóxicos, são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas 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 de produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (SINDAG, 2005).

Quanto à classe química os pesticidas podem ser classificados entre três grandes grupos: os organoclorados, os inibidores de colinesterase (organofosforados e carbamatos), as piretrinas naturais e sintéticas (EMBRAPA, 2004).

Os pesticidas também podem ser classificados, quanto:

- à sua ação – são classificados em três classes principais: inseticidas, fungicidas e herbicidas. Existem também os bactericidas, acaricidas, raticidas, formicidas e algicidas, porém estes apresentam menor uso.
- à sua forma de atuação – os pesticidas podem ser sistêmicos e não sistêmicos. Os sistêmicos são transportados através da seiva do vegetal em concentração letal ao inseto. Os pesticidas não sistêmicos possuem ação de contato (via dérmica), penetração (ação translaminar), ingestão (via oral) e fumigante (via respiratória). Os pesticidas sistêmicos possuem a vantagem de serem seletivos atacando a praga alvo e provocando um menor impacto no ambiente, porém, como o pesticida encontra-se no interior do fruto é necessário

respeitar o intervalo de carência para a comercialização do produto, evitando a contaminação do consumidor (FELLENBERG, 1980).

- à sua origem – os pesticidas podem ser inorgânicos como por exemplo: chumbo, arsênio, mercúrio, calda bordalesa (mistura de sulfato de cobre II e hidróxido de cálcio em água) e orgânicos como por exemplo: óleos animais, óleos minerais, óleos vegetais e os organo-sintéticos (ETO, 1977).
- à sua toxicologia⁴ – os pesticidas são classificados como: extremamente tóxico (classe toxicológica: I), altamente tóxico (classe toxicológica: II), medianamente tóxico (classe toxicológica: III), pouco tóxico (classe toxicológica: IV) e relativamente tóxico (classe toxicológica: V). Esta classificação é feita com base na DL₅₀⁵ (ZAMBRONE et al, 1986).
- à sua estrutura química – os pesticidas são classificados de acordo com a sua função química em clorados, fosforados, carbamatos, piretróides, tiocarbamatos, derivados da uréia etc (DÓREA, 1999).

⁴I - extremamente tóxico (formulações sólidas que apresentam DL₅₀ até 5 mg/kg para ratos), II - altamente tóxico (5-50 mg/kg), III - moderadamente tóxico (50-500 mg/kg), IV – pouco tóxico (500-5000 mg/kg), V – relativamente tóxico (acima de 5000 mg/kg), (ANVISA, 2005).

⁵DL₅₀ – dose necessária para causar uma resposta em 50% de uma população selecionada para determinar o efeito letal (FAO/OMS, 1994).

A Tabela 1 mostra a classificação dos pesticidas selecionados para o estudo, quanto ao seu modo de ação, forma de atuação, classe toxicológica e função química.

TABELA 1: Classificação dos pesticidas selecionados para estudo

| Pesticidas | Modo de ação | Forma de atuação | Classe toxicológica | Classe química (fórmula) |
|--------------------|------------------------|------------------|---------------------------|--|
| Dimetoato | Inseticida e acaricida | Sistêmico | II- altamente tóxico | Organofosforado (C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂) |
| Parationa metílica | Inseticida e acaricida | Não sistêmico | I- extremamente tóxico | Organofosforado (C ₈ H ₁₀ NO ₅ PS) |
| Malationa | Inseticida e acaricida | Não sistêmico | III-moderadamente tóxico | Organofosforado (C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂) |
| Tebuconazol | Fungicida | Sistêmico | IV- pouco tóxico | Azol (C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O) |
| Cipermetrina (cis) | Inseticida | Não sistêmico | II - relativamente tóxico | Piretróide (C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃) |

FONTE: ANVISA, 2004.

Dados de 1998 indicam que a aplicação de pesticidas no controle de pragas e doenças no Brasil atingiu proporções impressionantes, gerando um faturamento bruto das empresas fabricantes da ordem de US\$ 2,5 bilhões. O consumo de pesticidas no Brasil é de aproximadamente 3,2 kg de ingrediente ativo por hectare (BASTOS, 2004).

O Brasil desponta, atualmente, como o maior produtor de pesticidas da América Latina e o terceiro maior consumidor e importador mundial (PINHEIRO, 2004). Em relação ao consumo em kg/ha, o Brasil é o oitavo maior consumidor mundial. Países como Holanda, Bélgica, Itália, Alemanha e França possuem uma atividade agrícola mais intensa, que acarreta em um maior consumo de pesticidas por área cultivada. A Holanda apresenta um consumo de pesticidas em kg/ha seis vezes maior que o Brasil, porém a

área utilizada em atividades agrícolas é menor. Este consumo elevado de pesticidas por área cultivada é uma consequência da intensa atividade agrícola destes países.

A Figura 1 mostra uma comparação do consumo de pesticidas em kg/ha em alguns países.

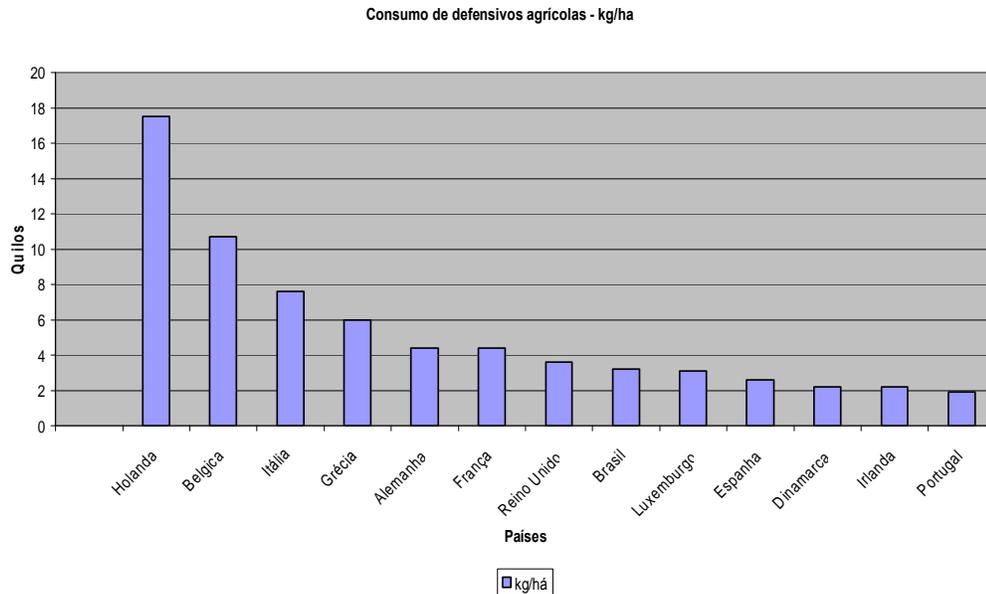


FIGURA 1: Comparação do consumo de pesticidas em kg/ha em alguns países.

FONTE: SINDAG, 2004

A Tabela 2 mostra dados do SINDAG de 1999, referente à distribuição do consumo de pesticidas no Brasil por estados. Os estados das regiões Sudeste e Sul são os maiores consumidores de pesticidas do Brasil, devido a sua grande atividade agrícola e pecuária. Destacam-se os estados de São Paulo e Rio Grande do Sul como os maiores consumidores de pesticidas do Brasil. O Estado de Sergipe consome 0,42% do total comercializado no Brasil.

TABELA 2: Distribuição do consumo de pesticidas no Brasil por estados (Base: 1999)

| Estado | Consumo (%) |
|--------------------|-------------|
| São Paulo | 24,26 |
| Rio Grande do Sul | 17,26 |
| Minas Gerais | 10,88 |
| Paraná | 10,81 |
| Mato Grosso | 7,38 |
| Goiás | 6,73 |
| Bahia | 4,39 |
| Mato Grosso do Sul | 4,10 |
| Sergipe | 0,42 |
| Outros | 13,77 |

FONTE: SINDAG, 2004

A quantidade de princípios ativos disponibilizados para a comercialização também é crescente, acompanhando o crescimento de consumo e disponibilizando para os produtores um maior número de princípios ativos, com novas formulações, oferecendo mais opções de consumo aos produtores agrícolas. No período de julho de 1992 a setembro de 2002, houve um aumento de 43,2% no número de princípios ativos, ou seja, 194 princípios ativos eram comercializados em 1992 aumentando para 278 princípios ativos em 2002. A Figura 2 mostra este crescimento.

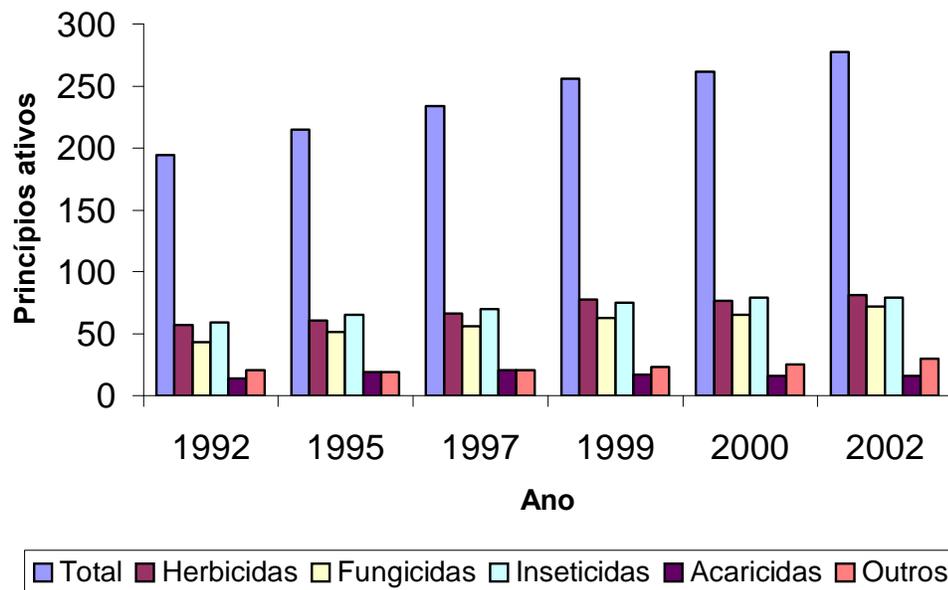


FIGURA 2: Defensivos agrícolas em linha de comercialização por ingredientes ativos
FONTE: SINDAG, 2004

Analisando os dados do SINDAG de 2004 na Figura 3, que apresenta os pesticidas em linha de comercialização por classes toxicológicas, observa-se que entre o período de 1992 e 2002 ocorreu um considerável aumento no número de pesticidas em linha de comercialização, com uma significativa queda no ano de 2003. Ocorreu um aumento de 67 para 139 em relação ao número de pesticidas da classe IV (Pouco tóxico), correspondendo a um aumento de 107,4%.

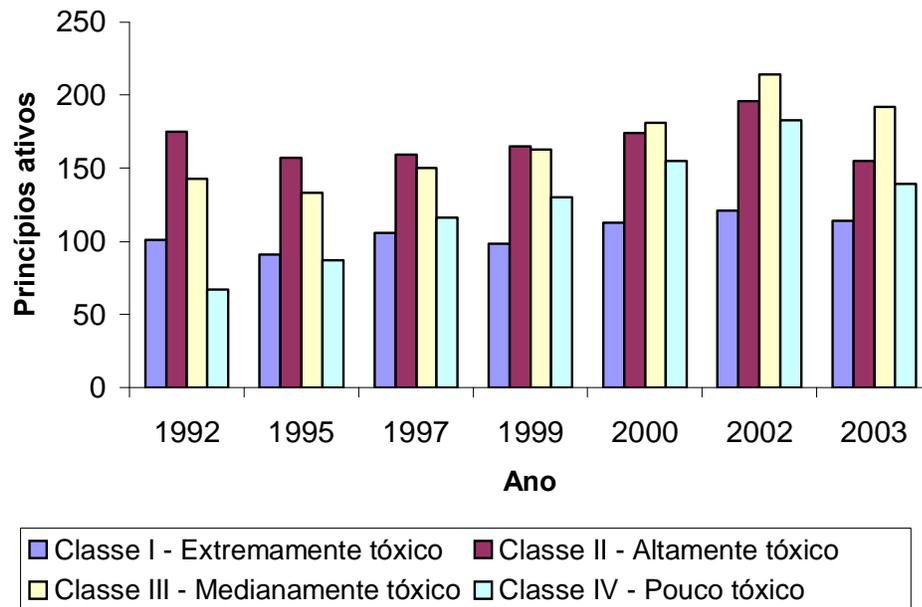


FIGURA 3: Pesticidas em linha de comercialização por classes toxicológicas.

FONTE: SINDAG, 2004.

Para os pesticidas da classe III (Medianamente tóxico) ocorreu um aumento de 143 para 192, correspondendo a um aumento de 34,2%. Para os pesticidas da classe II (Altamente tóxico) ocorreu uma pequena queda de 175 para 157, correspondendo a uma queda de 11,4%. Para os pesticidas da classe I (Extremamente tóxico) ocorreu um pequeno aumento de 101 para 114, correspondendo a um aumento de 12,8%. Com relação às porcentagens de pesticidas comercializados neste período, observa-se que a porcentagem de pesticidas extremamente tóxicos não sofreu grande variação neste período. Porém, ocorreu uma significativa queda na comercialização de pesticidas altamente tóxicos e considerável aumento na comercialização dos pesticidas pouco tóxicos.

Segundo Fellenberg (1980) a quantidade de pesticidas que não atinge seu destino corresponde a uma taxa de 50%, se perdendo para o meio ambiente como um contaminante do mesmo. Os pesticidas, mesmo quando aplicados diretamente nas plantas, boa parte dos pesticidas tem o solo como

destino. Uma vez no solo, os pesticidas têm seu destino influenciado por três formas principais de transporte: volatilização, lixiviação e escoamento superficial. Desta forma os pesticidas podem atingir as águas subterrâneas e superficiais (SPADOTTO,2002).

4.1.2 – Estrutura e atividade dos pesticidas

4.1.2.1 - Organofosforados

O primeiro éster fosforado foi sintetizado em 1820 por Lassaigne (MORAES, 1999). São compostos orgânicos pertencentes à função éster à base de fósforo, derivados do ácido fosfórico, do ácido tiosfosfórico ou do ácido ditiosfosfórico. A figura 4 mostra a estrutura geral dos organofosforados.

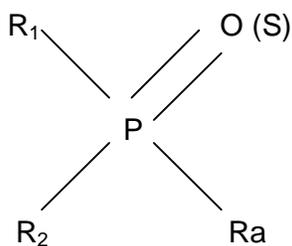


FIGURA 4: Estrutura geral dos ésteres organofosforados.

O radical **Ra** corresponde a um resíduo ácido qualquer e os radicais **R₁** e **R₂** correspondem a radicais alquila, arila, alcoxi ou amino. A atividade do éster depende dos diversos radicais ligados ao átomo de fósforo e, às vezes, pequenas modificações nestes radicais podem afetar grandemente a toxicidade do composto. A substituição de radicais metil em **R₁** e **R₂** por radicais etil aumenta a toxicidade do pesticida.

Os pesticidas organofosforados são classificados nas seguintes classes fundamentais: fosfato, fosforotionato, fosforoditionato, fosforotiolato, fosforoamidato e pirofosfato.

Os pesticidas organofosforados são os inseticidas mais utilizados na agricultura e em ambientes domésticos. Estes compostos são ainda utilizados em campanhas de saúde pública no controle de vetores, como o da malária e de outras doenças, como a dengue (MORAES, 1999).

4.1.2.2 – Piretróides

Os piretróides são análogos sintéticos das piretrinas. O piretro é obtido a partir das flores de plantas pertencentes ao gênero *Chrysanthemum* (*Pyrethrum*) e espécie *cinerariaefolium* que possui as piretrinas como seus componentes ativos. A síntese do ácido crisantêmico abriu novos caminhos para a obtenção de piretróides, que são os análogos sintéticos das piretrinas. A sua difusão teve início na década de 40 e atualmente é um dos inseticidas em maior uso. Os piretróides foram desenvolvidos com a finalidade de obter compostos com maior potência inseticida e com menor toxicidade aos mamíferos, além de apresentarem algumas outras vantagens em relação às piretrinas, tais como: menor custo de obtenção e maior facilidade de uso, pois os compostos naturais são difíceis de conservar o extrato e são instáveis na presença do ar e da luz (KASCHERES e CUNHA, 1989).

A estrutura geral dos piretróides pode ser dividida em três partes: O radical **R'** do éster é derivado de um álcool (parte alcoólica), a parte **A** que representa o crisantamato e a parte ácida representada por **B**. Observar a Figura 5.

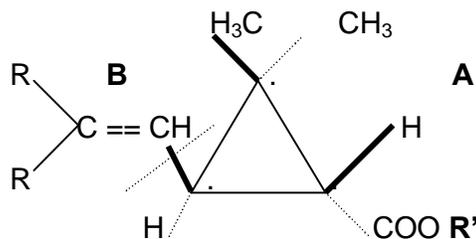


FIGURA 5: Estrutura geral dos piretróides

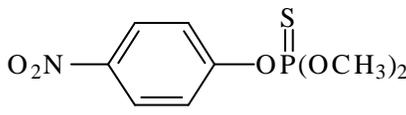
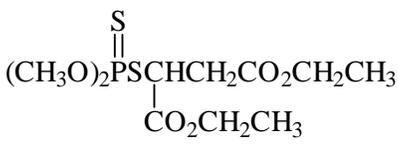
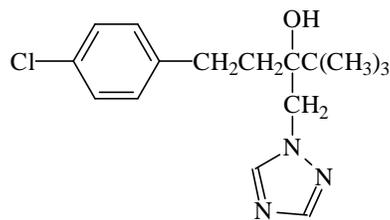
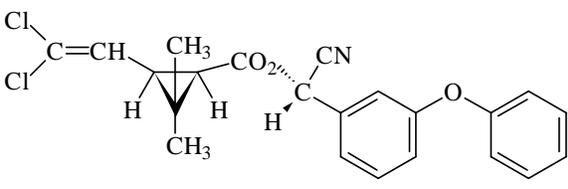
Os ésteres dos ácidos carboxílicos di-halovinílicos ciclopropanos (halopiretróides) são os mais potentes inseticidas piretróides encontrados, com maior estabilidade na presença do ar e da luz. Alterações nos radicais **R** da parte ácida e **R'** na parte alcoólica do éster provocam alterações na atividade e estabilidade dos compostos (KASCHERES e CUNHA, 1989). Substituindo-se os átomos de cloro da parte ácida da cipermetrina por bromo obtém-se a deltametrina, que apresenta uma maior atividade inseticida.

4.1.2.3 – Azol

Os azóis são caracterizados por apresentarem a estrutura do 1,2,4-triazol em sua estrutura molecular (observar a estrutura do tebuconazol na Tabela 3). O tebuconazol é um fungicida sintético e atua inibindo a dimetilação de esteróides. É estável em temperaturas elevadas e em presença de água. Ele sofre hidrólise em um tempo maior do que um ano (ROBERTS & HUDSON, 1999).

A Tabela 3 mostra as estruturas moleculares dos pesticidas selecionados para este estudo.

TABELA 3: Pesticidas selecionados para o presente estudo.

| Pesticidas | MM* | Estrutura |
|--|-------|---|
| Dimetoato O,O-dimetil-S-(N-metil-Carbamoil-metil) | 229,2 | $\text{CH}_3\text{NHCOCH}_2\text{SP}(\text{OCH}_3)_2$  |
| Parationa metilica O,O-dimetil-O-(4-nitrofenil) fosforotioato) | 263,2 |  |
| Malationa O,O-dimetil-S-(etil-1,2-dicarboetoxi) fosforoditioato | 330,3 | $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{P}(\text{S})\text{CH}(\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$  |
| Tebuconazol Alfa-terc-butil-alfa-(p-clorofenetil)-1H-1,2,4-triazol-1-etanol | 307,8 |  |
| Cipermetrina Alfa-ciano-3-fenoxibenzil-2,2-dimetil-3-(2,2-diclorovinil) ciclopropano carboxilato | 416,3 |  |

FONTE: ANVISA, 2004.

*Massa molecular

A Tabela 4 mostra algumas propriedades físico-químicas dos pesticidas selecionados para o estudo.

TABELA 4: Propriedades físico-químicas dos pesticidas estudados.

| Pesticida | Peso molecular | DT ₅₀ [#] (h) | Log k _{ow} [*] | Solubilidade (g/L) | | |
|--------------------|----------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------|------|--------|
| | | | | Água | DCM | Hexano |
| Dimetoato | 229,2 | 12,0 | 0,70 | 23,8 | >300 | >300 |
| Parationa metílica | 263,2 | 43,0 | 3,00 | 0,055 | >200 | 10-20 |
| Malationa | 330,3 | 7,8 | 2,74 | 0,145 | - | - |
| Tebuconazol | 307,8 | - | 3,70 | 0,032 | >200 | < 0,1 |
| Cipermetrina (cis) | 416,3 | - | 6,60 | 0,004 | - | 103,0 |

#DT₅₀= tempo de meia-vida; * Log k_{ow}= coeficiente de partição octanol:água

FONTE: TOMLIN, 1991.

4.1.3 – Aspectos toxicológicos dos pesticidas

A maioria dos inseticidas age sobre o sistema nervoso dos mamíferos e insetos. Desta forma, o potencial tóxico da maioria dos inseticidas é maior que o dos fungicidas e herbicidas. Estes inseticidas são neurotoxinas⁶ e podem ser classificados segundo o campo de atuação química sobre o nervo, receptores sinápticos ou acetilcolinesterase (BOWER, 1990).

A maioria dos pesticidas são solúveis em gordura (lipossolúveis), ocorrendo um acúmulo destas substâncias no organismo dos mamíferos. No homem e nos animais estes compostos se acumulam principalmente nos tecidos nervosos e nas gorduras. Como no tecido adiposo (gorduroso) e no sistema nervoso dos animais praticamente não contêm enzimas, são nestes locais que os pesticidas se mantêm por mais tempo no organismo (FELLENBERG, 1980).

Os organofosforados por serem hidrossolúveis, não se acumulam no tecido adiposo e conseqüentemente, são degradados mais rapidamente em tecidos vivos. Também possuem a vantagem de serem eliminados mais

rapidamente em mamíferos, quando comparados com os organoclorados. Mesmo com estas vantagens os pesticidas organofosforados são mais tóxicos que os organoclorados (DÓREA, 1999).

A atividade de uma substância tóxica depende sempre de sua concentração no organismo. Por este motivo, as doses máximas permissíveis de uma substância tóxica não são indicadas como uma quantidade absoluta, mas sempre em relação ao peso do indivíduo (g de substância/kg de peso corporal) (FELLENBERG, 1980).

A toxicidade dos organofosforados varia enormemente, sendo os de maior toxicidade usados na agricultura, os de toxicidade intermediária, como inseticidas para animais, e os de mais baixa toxicidade, podem ser usados como inseticidas domésticos (MORAES, 1999).

Estes agentes atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina (MORAES, 1999). A toxicidade dos organofosforados varia em função do tipo de radical alquila ligado ao fósforo e da presença ou não do oxigênio ligado ao átomo de fósforo na molécula. Quando existe a troca da ligação entre o fósforo e enxofre (P = S) para fósforo e oxigênio (P = O), o átomo de fósforo fica mais eletropositivo, possibilitando realizar um ataque mais eficaz na molécula da enzima acetilcolinesterase, esta troca aumenta a toxidez para insetos e mamíferos em duas a dez vezes. O tipo de radical alquila ligado ao átomo de fósforo também afeta a toxidez da molécula e sua capacidade de inibir a enzima AchE. Por exemplo, a substituição na parationa do radical metil (parationa metílica) por um radical etil (parationa etílica) aumenta a toxidez da molécula (DÓREA, 1999).

Um nervo transmite um impulso para outro ponto por meio de variações na concentração dos íons. A chegada da “frente iônica” ao terminal nervoso provoca a liberação da acetilcolina, que é responsável pela excitação de células, provocando uma resposta do músculo. Após esta excitação a acetilcolina deve ser removida, para não provocar movimentos

⁶ Neurotoxinas são substâncias venenosas, de alto poder agressivo, que lesam o sistema nervoso (KASCHERES E CUNHA, 1989)

repetitivos e descontrolados do músculo. O processo de remoção da acetilcolina é realizado através da reação de hidrólise que catalisada pela enzima acetilcolinesterase (Figura 6).

Testes de mutagenicidade realizados com a malationa apresentaram resultados fracamente positivos, ou seja, mutagenicidade relativamente baixa. Entretanto, testes realizados com formulações comerciais foram indutoras de aberrações cromossômicas e mutações genéticas, devido à presença de seu principal metabólito, o malaoxon (GRISOLIA, 1996).

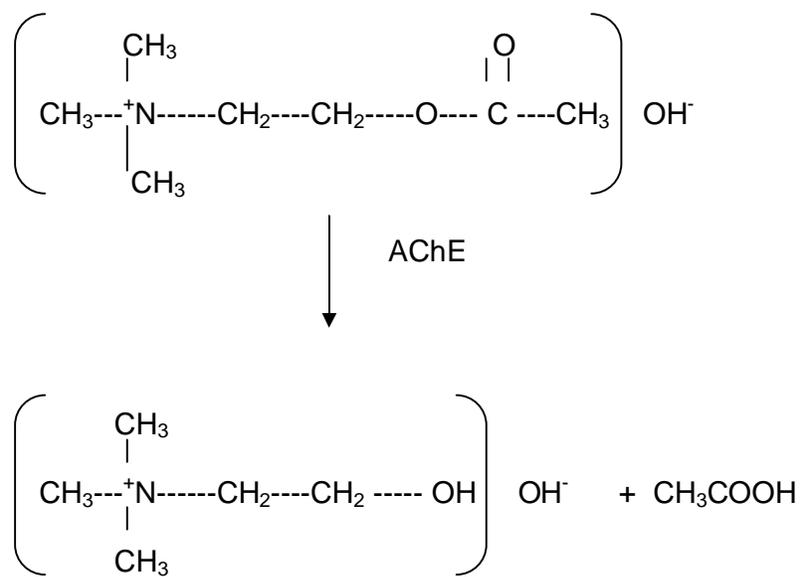


FIGURA 6: Mecanismo de decomposição da acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético catalisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE).

Os piretróides agem no canal de sódio da membrana do nervo. Para manter um determinado potencial iônico, o canal de sódio abre e fecha, segundo a necessidade, para manter o equilíbrio do potencial e o impulso ser transmitido normalmente. O piretróide modifica esta ação, mantendo o canal de sódio aberto. A corrente de sódio prolongada resulta em desordem

neuromuscular caracterizada por hiperexcitação com a perda da coordenação dos movimentos musculares voluntários, convulsões e morte final (DÓREA, 1999).

4.2 – A cultura do tomate e a produção brasileira.

O tomateiro (*Lycopersicon esculenum* Mill) é uma das mais importantes hortaliças cultivadas no mundo, tanto por área como pelo seu valor comercial. A planta é originária do continente americano, provavelmente da região Andina e da América Central, tendo sido posteriormente introduzido no México e depois levado para a Europa. O fruto possui elevados teores de caroteno, tiamina, nicotina, vitamina C e sais minerais, sendo considerado um dos mais importantes vegetais utilizados na alimentação humana (GAMBACORTA et al, 2004). O tomateiro vegeta bem em condições de clima quente, com temperaturas médias de 20°C e umidade relativa de 80 a 90%. A colheita tem início aproximadamente aos 100 a 120 dias após a sementeira. É feita manualmente e pode-se colher quando os frutos estão meio ou totalmente maduros, ou ainda verdes, mas plenamente desenvolvidos (PICANÇO et al, 2004).

A cultura do tomate vem ocupando um lugar de destaque dentre os cultivos de hortaliças no Brasil. Dados do IBGE referentes aos últimos anos indicam um cultivo anual entre 55 a 60 mil hectares, sendo 35 a 40 mil hectares cultivados para comercialização *in natura* com uma produção de 1,5 a 1,7 milhões de toneladas e entre 18 a 20 mil hectares destinados ao processamento industrial com uma produção de 800 mil a 1 milhão de toneladas (AZEVEDO, 2004).

O Brasil é um dos grandes produtores mundiais de tomate, ocupando o nono lugar no ranking mundial, com uma produção em 1997 de 2,6 milhões de toneladas, apresentando uma produtividade média de 44 ton/ha (GOBO et al, 2004).

No Brasil destacam-se na produção desta hortaliça os Estados de São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco, Bahia e mais recentemente Goiás com cultivares industriais na região dos cerrados. Cerca de 40% da produção é destinada à indústria e o restante é destinado ao consumo *in natura*, com predominância na produção de frutos menores, mais duros e inteiramente vermelhos, que são conhecidos no hábito alimentar dos brasileiros como tomate tipo "mesa"(CARVALHO, 2004).

Para o mercado fresco, as regiões mais importantes são os Estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, embora a cultura seja encontrada em todos os outros Estados. Já os Estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e o Vale do São Francisco, entre Bahia e Pernambuco, são os mais importantes no cultivo para o processamento industrial e onde estão concentradas as principais indústrias processadoras de tomate (AZEVEDO, 2004).

O tomateiro pode ser considerado uma das poucas culturas em que pragas e doenças são igualmente importantes, podendo ser utilizado como hospedeiro para cerca de 200 espécies de artrópodes⁷. Os principais insetos sugadores e transmissores de virose são o pulgão (*Aphis gossypii* e *Mizus persicae*), o tripses (*Thrips tabaci*, *Thrips palmi*, *Frankliniella schutzei*), a traça do tomateiro (*Tuta absoluta*) e a mosca branca (*Bemisia tabaci* raça B ou *Bemisia argentifolii*), uma das mais importantes pragas desta cultura na atualidade. Na cultura do tomate sua presença é notória e crescente, ocasionando perda de produtividade e baixa qualidade devido às toxinas injetadas pelo inseto nos frutos (CARVALHO, 2004).

Dentre os insetos praga associados a essa cultura, vários pertencem à ordem Lepidóptera⁸, merecendo destaque a traça do tomateiro *Tuta absoluta* (Lepidóptera: Gelechiidae). Essa praga alimenta-se do tomate em todas as fases de crescimento da cultura. Os danos provocados por esse inseto podem reduzir a produção em até 50%. É grande o número de aplicações de

⁷Artrópodes – São animais de corpo metamérico com apêndices articulados e encerrado em um exoesqueleto quitinoso (BARNES, 1984).

⁸Lepidópteros – Borboletas e mariposas. São insetos de corpo mole cujas asas, corpo e apêndices são cobertos por escamas pigmentadas (BARNES, 1984).

inseticidas pelos tomaticultores no controle de pragas, sobretudo para a traça do tomateiro. Entretanto, a aplicação destes inseticidas não tem alcançado a eficiência de controle desejada (PICANÇO et al, 2004). Face à rápida proliferação de pragas, os agricultores realizam aplicações preventivas de pesticidas até duas vezes por semana, o que além de aumentar o custo da produção pode induzir resistência às pragas (MORAES, RESENDE, NAKAGAWA e LUCHINI, 2002). Entre as possíveis razões para esta baixa eficiência está a resistência dos insetos-praga a inseticidas. Como consequência da resistência, a dosagem e/ou o número de aplicações de inseticidas são aumentados, gerando problemas ecológicos, econômicos e toxicológicos (PICANÇO et al, 2004).

Os fungos fitopatogênicos são responsáveis por grandes problemas na tomaticultura, pois cerca de 40% do custo de produção do tomate é atribuída a fungicidas utilizados no controle das doenças foliares. As principais doenças fúngicas da cultura do tomate são: o tombamento de mudas, causado por fungos no solo (*Pythium*, *Rhizoctonia* e *Phytophthora*); requeima ou mela, causado pelo fungo *Phytophthora infestans*; septoriose causado pelo fungo *Septoria lycopersici*; mancha-de-estenfílio causado pelos fungos *Stemphylium solani* e *S. Lycopersici*; Mancha-de-cladospório causado pelo fungo *Cladosporium fulvum*; Antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum phomoides* (AZEVEDO, 2004).

Em termos de quantidade total de ingrediente-ativo, as culturas de citros, soja e cana-de-açúcar são as que mais consomem pesticidas no Brasil. Estas culturas consomem grande quantidade de pesticidas em função de ocuparem extensas áreas agrícolas no Brasil e não por serem aplicados intensivamente por unidade de área cultivada. Outras culturas agrícolas, apesar de ocuparem áreas pouco extensas, destacam-se pelo uso intensivo de pesticidas por unidade de área cultivada, como as de tomate e batata (SPADOTTO et al, 1998). Como pode ser observado na Tabela 5.

TABELA 5: Consumo de pesticidas em algumas culturas agrícolas no Brasil, em quantidade de ingrediente ativo.

| Cultura Agrícola | Quantidade (Toneladas) | Participação (%) |
|------------------|------------------------|------------------|
| Citros | 11.154 | 17,5 |
| Soja | 9.929 | 15,6 |
| Cana-de-Açúcar | 6.211 | 9,8 |
| Batata | 3.450 | 5,4 |
| Tomate | 2.109 | 3,3 |
| Total | 32.853 | 51,6 |

FONTE: SPADOTTO, 1998

A cultura do tomate é a quinta em consumo de pesticidas. As aplicações de pesticidas são realizadas com uma maior frequência por ser um fruto muito susceptível ao ataque de pragas, caracterizando um tratamento químico bastante intenso.

A Tabela 6 mostra a quantidade de ingrediente-ativo em quilogramas que são aplicados por hectare de algumas culturas, pode-se observar uma grande diferença entre o consumo de pesticidas na cultura do tomate e nas demais culturas. O consumo por unidade de área chega a ser quase três vezes maior que na cultura de citros e cerca de quarenta vezes maior que na cultura da soja. Desta maneira é possível notar como na cultura do tomate há uma aplicação freqüente e intensa de pesticidas para controlar e eliminar as pragas. Como consequência destas aplicações, o tomate que é predominantemente consumido *in natura* pode apresentar uma quantidade de resíduos dos pesticidas aplicados acima dos valores permitidos pela legislação, constituindo uma perigosa fonte de contaminação de forma indireta da população.

TABELA 6: Consumo de pesticidas por unidade de área em algumas culturas agrícolas no Brasil, em quantidade de ingrediente ativo.

| Cultura Agrícola | Quantidade (kg/ha) |
|------------------|--------------------|
| Tomate | 39,5 |
| Batata | 21,8 |
| Citros | 12,2 |
| Cana-de-Açúcar | 1,6 |
| Soja | 0,9 |

FONTE: SPADOTTO,1998

Atualmente 126 princípios ativos são registrados e autorizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004) para serem utilizados na cultura do tomate. A seleção dos pesticidas para serem utilizados neste trabalho, foi feita após uma pesquisa de campo para verificar quais princípios ativos são utilizados pelos produtores de tomate da região de Itabaiana/SE que fornecem boa parte dos tomates comercializados na cidade de Aracaju, bem como a disponibilidade do padrão de cada pesticida no laboratório. Deste grupo de compostos foram escolhidos cinco princípios ativos: cipermetrina (cis), dimetoato, malationa, tebuconazol e a parationa-metífica. Este último não é autorizado para a cultura do tomate, porém, em pesquisa de campo (propriedade produtora de tomate localizada no município de Itabaiana/SE) foi constatada a sua utilização no cultivo do tomate.

É importante que os agricultores procurem adequar as suas práticas agrícolas às boas práticas agrícolas, para fornecer a população um produto saudável. Algumas práticas de simples execução são descritas por AZEVEDO (2004) para controlar doenças e pragas na cultura do tomate, como o uso de variedades resistentes, a adoção de espaçamentos adequados, adubação correta e o manejo da irrigação, que além de melhorarem a eficiência do controle químico, colaboram de maneira significativa para a redução do número de pulverizações e,

conseqüentemente, do custo de produção e da contaminação do agricultor e do meio-ambiente.

A Tabela 7 mostra algumas informações dos pesticidas estudados que são utilizados na cultura do tomate.

TABELA 7: Características dos pesticidas selecionados para este estudo

| Pesticida | Aplicação | LMR (mg/kg) | IDA (mg/kg) | Intervalo (dias) |
|---------------------|-----------|-------------|-------------|------------------|
| Dimetoato | Foliar | 1,00 | 0,002 | 14 |
| | Solo | 1,00 | 0,020 | 01 |
| Parationa metílica* | Foliar | 0,20 | 0,020 | - |
| Malationa | Foliar | 3,00 | 0,300 | 03 |
| Tebuconazol | Foliar | 0,10 | 0,030 | 07 |
| Cipermetrina (cis) | Foliar | 0,10 | 0,050 | 10 |

FONTE: ANVISA, 2004

***FONTE:** CODEX FAO/OMS, 1994.

4.3 – Dispersão da matriz em fase sólida (MSPD)

A extração dos analitos da matriz é a etapa mais trabalhosa no desenvolvimento de uma metodologia analítica. A técnica de extração que deve ser utilizada em um procedimento analítico para isolar os analitos de interesse está diretamente relacionada com o tipo de matriz que será estudada. Atualmente, dispõe-se de várias técnicas de extração, como a extração líquido-líquido (LLE), a extração em fase sólida (SPE), a micro-extração em fase sólida (SPME), a extração com fluido supercrítico (SFE) e a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) entre outras (DÓREA e LOPES, 2004).

A extração em fase sólida (SPE) é aplicada para amostras líquidas, relativamente não-viscosas, livres de material particulado e no estado homogêneo. Entretanto, várias matrizes são sólidas ou semi-sólidas e não se encaixam nestas condições. Matrizes de origem biológica, tais como:

tecido e músculos de animais, frutas e vegetais são exemplos desta situação. Para estas amostras ficarem em condições de ser utilizado a extração em fase sólida, inicialmente é necessário fazer uma homogeneização e romper a arquitetura da amostra, para permitir e assegurar o acesso e o contato dos solventes e reagentes que serão utilizados para isolar os analitos de interesse da matriz.

A destruição da arquitetura da amostra envolve uma série de processos, tais como: triturar, picar ou pulverizar a amostra. Pode ser feita também adição de solventes, ácidos, bases, soluções salinas, abrasivos e agentes quelantes para auxiliar na destruição da estrutura celular. Porém, estes procedimentos podem ocasionar a liberação de outros compostos provenientes da matriz que não são de interesse (BARKER, 1998).

A técnica de extração denominada de dispersão da matriz em fase sólida (Matrix solid-phase dispersion – MSPD) é bastante semelhante à extração em fase sólida (SPE), diferenciando-se apenas pelo fato da matriz estar diretamente dispersa em uma substância adsorvente ou fase quimicamente ligada, permitindo a realização simultânea de várias etapas no preparo da amostra. Várias aplicações já foram descritas em artigos científicos, como a extração de drogas de alimentos, carbofuran de milho, PCBs de peixes, clenbuterol de fígado bovino, tetraciclina de alimentos e pesticidas de várias matrizes (LANÇAS, 2004).

Esta técnica foi criada a partir de modificações na extração em fase sólida com o objetivo de utilizar matrizes sólidas ou semi-sólidas, como também amostras líquidas com a vantagem de não ser necessário a realização de etapas para tornar a amostra líquida e homogênea sem a presença de material particulado como requer a extração em fase sólida. A extração por dispersão da matriz em fase sólida tem apresentado uma eficiência tão boa quanto a SPE e LLE, apresentando algumas vantagens em relação ao consumo de solventes orgânicos durante a etapa de eluição, como também em relação ao tempo gasto durante o processo de extração (DÓREA, 1999).

A dispersão da matriz em fase sólida utiliza um suporte sólido (adsorvente) ou fase quimicamente ligada, tais como: Florisil, alumina, sílica, C₁₈ ou C₈ entre outros (Tabela 8), na qual a matriz é dispersa e homogeneizada até obter uma massa uniforme, permitindo que haja uma maior interação entre a fase sólida e a matriz (LANÇAS, 2004).

TABELA 8: Adsorventes mais empregados na extração MSPD.

| | | | |
|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| $(\text{SiO}_2)_n - \text{OH}$ | $(\text{Al}_2\text{O}_3)_n$ | $\text{Mg}.\text{Al}(\text{SiO}_4)_n$ | C ₁₈ |
| Sílica gel | Alumina | Florisil | Octadecilsilano |

FONTE: LANÇAS, 2004

O adsorvente exerce um papel fundamental no processo de extração dos analitos através da técnica por dispersão da matriz em fase sólida. Entretanto, é difícil selecionar um adsorvente que seja eficiente na extração de um conjunto de substâncias pertencentes a funções químicas diferentes e que possuem diferentes tipos de interações com o adsorvente. Dentre estes adsorventes o Florisil é o mais polar e muito utilizado em extrações de pesticidas, como descrito por Alberio et al (2003) e Zuin et al (2003). O C₁₈ possui caráter não apolar, sendo apropriado para extração de compostos hidrofóbicos. A utilização do C₁₈ é descrita por Barker (1998) e Navarro et al (2002). A sílica possui uma superfície ligeiramente ácida que facilita a retenção de compostos básicos. Este adsorvente foi utilizado por Dórea e Lopes (2004) e por Michel e Buszewsh (2004) na análise de pesticidas. Um problema do uso da sílica é que este adsorvente facilmente absorve água proveniente do ambiente do laboratório ou de solventes, pela formação de ligações de hidrogênio com os grupos silanóis. Como consequência, a superfície da sílica ficará recoberta com moléculas da água e os sítios onde ocorrem esse fenômeno não estarão disponíveis para adsorção, diminuindo a sua capacidade de adsorção (LANÇAS, 2004). Alumina é um adsorvente de caráter anfótero, podendo ser utilizado na adsorção tanto de analitos de

caráter ácido como de caráter básico. Segundo ALBERO et al (2003), terra diatomácea também tem sido utilizada na extração por MSPD para determinação de um conjunto de pesticidas em suco de frutas.

A escolha do suporte-adsorvente recai na polaridade do analito e na natureza da matriz. Para aplicações que requerem uma fase lipofílica quimicamente ligada, geralmente o suporte-adsorvente faz uso de materiais como C_{18} e C_8 (DÓREA e LOPES, 2004). O C_{18} é muito utilizado na extração de analitos de matrizes biológicas (BARKER, 1998). A sílica é o adsorvente mais utilizado para propósitos gerais, enquanto o Florisil é muito utilizado na análise de pesticidas. Florisil deve ser utilizado com reservas em análises de compostos polares, uma vez que poderá provocar adsorção irreversível em sua superfície e o analito de interesse poderá não ser mais removido com os eluentes comumente empregados nessa técnica (LANÇAS, 2004).

Porém a escolha do melhor adsorvente para um determinado grupo de analitos que devem ser isolados de uma matriz é feita na prática, levando-se em consideração principalmente os valores das recuperações obtidos após a realização das extrações e a quantidade de substâncias endógenas extraídas da matriz, pois estas substâncias podem atuar como impurezas no extrato final e interferir na quantificação dos analitos de interesse (KRISTENSON, 2001).

O suporte sólido possui várias funções. Primeiro, ele atua como um abrasivo que irá provocar a destruição geral da arquitetura da matriz; segundo, funciona como adsorvente de compostos da matriz; terceiro, a mistura obtida entre a matriz e o adsorvente pode ser colocado em uma coluna e os analitos podem ser posteriormente eluídos com um eluente; quarto, a matriz distribuída no suporte produz um único material com a fase sólida da coluna, permitindo um novo grau de fracionamento da mistura (BARKER, 1998). Ao romper a arquitetura da matriz, o adsorvente que atua como abrasivo permite que os analitos presentes passem a interagir com o adsorvente, facilitando o isolamento destes analitos e o processo de extração.

A proporção em massa entre a amostra e o suporte sólido varia com o tipo de suporte sólido e o tipo de matriz, sendo necessário à otimização desta proporção durante o desenvolvimento da metodologia analítica (BARKER, 1998). Utilizando esta técnica, Dórea e Sobrinho (2004) utilizaram uma proporção de 5:1 na determinação de resíduos de pesticidas em arroz. Michel e Kuszewski (2004) utilizaram uma proporção de 8:5 na determinação de resíduos de pesticidas em plantas medicinais.

O condicionamento ou pré-lavagem do material para ser usado na dispersão da matriz em fase sólida pode aumentar grandemente a recuperação do analito. Este condicionamento é essencial e pode ser feito com a passagem de um solvente que ativa o adsorvente quebrando as tensões superficiais existentes entre a amostra e o suporte sólido. Esta pré-lavagem também elimina contaminantes (BARKER, 1998).

Na coluna MSPD podem ocorrer modificações nas características da matriz no momento da mistura. A ionização ou supressão de ionização dos analitos e dos componentes da amostra que pode ocorrer irá afetar grandemente a natureza das interações do analito específico com a mistura e com o solvente de eluição (BARKER, 1988). Estes fenômenos podem aumentar ou diminuir a intensidade das interações entre os analitos e a matriz, analitos e eluente, compostos provenientes da matriz com os analitos ou compostos da matriz com o eluente.

As interações observadas entre os componentes individuais e os analitos de interesse na dispersão da matriz em fase sólida envolvem interações do analito com o suporte sólido, do analito com a fase quimicamente ligada, do analito com a matriz dispersa, da matriz com o suporte sólido, da matriz com a fase quimicamente ligada, a interação de todos os componentes de interesse com os solventes e interações dinâmicas entre todos ocorrendo simultaneamente (BARKER, 1998).

Provavelmente os fatores que mais controlam a dispersão da matriz em fase sólida e a sua eficiência no processo de extração, seja a deposição da fase sólida (matriz e adsorvente) na coluna, com suas interações, em combinação com a distribuição do analito e suas interações. Assim como em

SPE, o suporte sólido, a fase quimicamente ligada e o solvente de eluição são parâmetros críticos, mas eles certamente têm influência menor do que a dispersão da matriz do topo até a base da coluna MSPD. Comparativamente em SPE, a maioria das substâncias da amostra é retida somente nos primeiros milímetros da coluna, enquanto que em MSPD a deposição da amostra com o adsorvente na coluna é uniforme por toda sua extensão (DÓREA e LOPES, 2004).

O processo de separação está intimamente ligado a processos químicos e físicos existentes entre os analitos e o adsorvente. As interações que ocorrem entre as moléculas dos analitos ou da matriz com o adsorvente podem ser iônicas ou atrações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido ou dipolo induzido-dipolo induzido. O isolamento dos analitos de interesse envolve inicialmente uma ruptura da estrutura molecular da matriz para que o adsorvente comece a interagir com os analitos, provocando a ruptura de interações existentes entre os analitos e a matriz e a formação de novas interações entre os analitos e o adsorvente, ou seja, adsorção dos analitos no suporte sólido, removendo-os da matriz. Seqüencialmente é feita a eluição ou desorção dos analitos através da passagem de um solvente (eluente) pela mistura (LANÇAS, 2004).

A natureza da coluna MSPD e a extensão das interações existentes permitem isolar analitos de polaridades diferentes ou de uma classe de compostos, em um simples solvente ou em diferentes solventes, passando estes através da coluna. Uma suave variação na polaridade do solvente pode ser utilizada para um completo fracionamento da mistura. Os analitos são eluídos utilizando-se 8 mL de solvente e os mesmos são eluídos nos primeiros 4 mL, porém, este volume pode ser variável a depender da matriz e do solvente utilizado (BARKER, 1998). Podendo ser necessário um maior volume de solvente para garantir a completa eluição dos analitos.

Para a escolha do solvente que será utilizado na etapa de eluição é necessário levar em consideração a sua polaridade, pois ele deve eluir os analitos de interesse e não permitir a eluição de interferentes presentes na

matriz preferencialmente. Uma ferramenta útil para esta escolha é a tabela que lista a polaridade relativa dos solventes associada com uma fase sólida (adsorvente), denominada de série eluotrópica, que lista os valores eluotrópico de cada solvente (ϵ°) associado ao adsorvente estudado. Os valores eluotrópicos foram obtidos a partir de um estudo criterioso da força com a qual vários solventes conseguem eluir determinados solutos adsorvidos em uma fase sólida. Quanto maior o valor eluotrópico (ϵ°) do solvente, maior será sua força de eluição e, portanto, mais facilmente removerá o analito da fase sólida. Para uma boa eficiência nesta etapa de extração, o volume do solvente a ser utilizado na eluição deve ser o mínimo necessário e passado através da mistura em pequenos volumes com um fluxo contínuo, permitindo assim, uma maior interação entre o eluente e os analitos. É importante não deixar que durante a passagem do eluente ocorra a secagem do cartucho MSPD, pois pode provocar a formação de caminhos preferenciais e conseqüentemente perda de eficiência na extração (LANÇAS,2004).

Em alguns casos, o eluído da coluna MSPD já se encontra suficientemente limpo, podendo ser injetado diretamente no cromatógrafo. Entretanto, muitas vezes torna-se necessário realizar uma etapa adicional para remover contaminantes provenientes da matriz. A remoção destes contaminantes pode ser feita utilizando-se outra fase sólida no fundo da coluna MSPD (co-coluna) ou conectando-se uma segunda coluna SPE na coluna MSPD (BARKER, 1998).

A técnica por MSPD pode ser aplicada para extração e análises em diferentes tipos de matrizes e compostos. Na maioria dos casos a dispersão da matriz em fase sólida tem apresentado resultados equivalentes com outras metodologias já descritas na literatura e aceitas, tais como a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida. Entretanto, o MSPD geralmente consome 95% menos solvente e requer um tempo 90% menor que outras metodologias oficiais. (BARKER, 1998). Pequena quantidade de amostra, pouco consumo de solvente orgânico, poucas etapas envolvidas, sem manipulações químicas complicadas da amostra, conferem a essa técnica um ganho em termos de tempo, consumo de solvente e uma utilização

mínima de materiais, tornando-a atrativa quando comparada com as técnicas clássicas de extração de pesticidas (DÓREA e LOPES, 2003).

4.4. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

A cromatografia é um poderoso método de separação que pode ser empregado em várias áreas da ciência. Em suas diferentes formas tem encontrado aplicações em praticamente todas as áreas do conhecimento nas quais a análise qualitativa ou quantitativa de espécies químicas deva ser realizada (LANÇAS, 2004), permitindo a separação de compostos em misturas complexas. Em todas as suas formas a amostra é arrastada por uma fase móvel, passando por uma coluna ou superfície sólida que possui uma fase estacionária. A amostra é então distribuída entre estas duas fases, de modo que os componentes que são mais fortemente retidos na fase estacionária movam-se mais lentamente enquanto que os compostos que possuem interações mais fracas com a fase estacionária movam-se com maior velocidade. Esta diferença de interação entre os diversos compostos permite a separação dos constituintes de uma mistura. Como consequência, os tempos gastos para cada constituinte da mistura chegar ao detector são diferentes, permitindo a identificação e quantificação dos mesmos.

O tempo de retenção de um analito corresponde ao tempo que após a injeção da amostra, o analito gasta para percorrer toda a coluna e chegar ao detector. Esta medida é importante para identificação e observação da separação dos analitos. A habilidade que uma coluna possui em separar dois analitos está relacionada com a sua resolução. Um parâmetro importante que é utilizado para calcular o poder de resolução de uma coluna é o fator de separação entre dois analitos. O fator de separação entre dois analitos A e B é calculado pela seguinte relação.

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

Onde: $(t_R)_B$ é o tempo de retenção do analito B, $(t_R)_A$ é o tempo de retenção do analito A e t_M é o tempo morto. O tempo morto é o tempo médio necessário para que uma molécula da fase móvel passe através da coluna. Outro parâmetro usado em medidas quantitativas de eficiência de uma coluna cromatográfica é o número de pratos teóricos. A eficiência de uma coluna cromatográfica aumenta à medida que o número de pratos torna-se maior e que a altura do prato diminui. Considera-se que, em cada prato teórico, ocorre o equilíbrio do analito entre a fase móvel e a fase estacionária. O número de pratos teóricos e a altura do prato, estão relacionados através da expressão.

$$N = L/H$$

Onde: L é o comprimento da coluna em centímetros e H é a altura equivalente a um prato teórico. A altura equivalente de um prato teórico pode ser calculada experimentalmente através da relação.

$$H = \frac{LW^2}{16 t_R^2}$$

Onde: W corresponde a magnitude da base do triângulo formado a partir das tangentes nos pontos de inflexão nos dois lados de um pico cromatográfico, que são prolongados para formar um triângulo com a linha de base do cromatograma. O número de pratos teóricos também pode ser calculado a

partir de duas medidas do tempo, t_R e W . O número de pratos teóricos é calculado através da relação.

$$N = 16 (t_R/W)^2$$

A resolução de uma coluna fornece uma medida quantitativa da capacidade em separar dois analitos. A resolução de uma coluna é definida como:

$$R = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

Uma resolução de 1,5 permite a separação essencialmente completa de dois analitos, apresentando uma superposição entre os picos de cerca de 0,3%. A resolução de uma coluna pode ser melhorada com o prolongamento da coluna, aumentando assim o número de pratos teóricos (GROB & BARRY, 2004).

Na cromatografia gasosa, a amostra é inicialmente vaporizada em uma câmara de vaporização e injetada na coluna. A amostra é então arrastada por uma fase móvel gasosa denominada de gás de arraste para dentro da coluna. O gás de arraste deve ser inerte e não deve interagir com as moléculas do analito, apenas deve transportar o analito através da coluna cromatográfica (SKOOG,2002). Os gases mais utilizados são: hélio, nitrogênio e hidrogênio. A escolha do gás é feita levando-se em consideração o tipo de detector existente no equipamento. Durante a passagem dos analitos através da coluna ocorre a formação de interações químicas entre os analitos e a fase estacionária existente na coluna cromatográfica, a intensidade destas forças depende diretamente do caráter polar da fase estacionária e da polaridade dos analitos. Quanto maior for a intensidade das forças existentes, mais tempo o analito fica retido na coluna cromatográfica e maior será o seu tempo de retenção.

Nas colunas capilares a fase estacionária é um filme de um líquido com espessura de alguns décimos de micrometro que reveste uniformemente o interior de um tubo capilar (SKOOG, 2002). As propriedades desejáveis para a fase estacionária de uma coluna cromatográfica, são: baixa volatilidade, estabilidade térmica, inércia química e características de solvente, ou seja, deve interagir com o analito sem reagir com o mesmo.

Os instrumentos de cromatografia gasosa acoplada com a espectrometria de massas são utilizados na identificação de centenas de componentes presentes em sistemas naturais e biológicos, permitindo a caracterização de substâncias em diversas amostras e a quantificação destes compostos.

Para se obter o espectro de massa de um analito, inicialmente as moléculas deste analito, na forma de vapor, são bombardeadas por um feixe de elétrons provocando a perda de um elétron por parte do analito com a formação de um íon molecular. O íon molecular é um íon radical que tem a mesma massa molecular da molécula. Este íon molecular ao colidir com elétrons energéticos, fica excitado e sofre uma fragmentação originando íons de massas menores. Os íons positivos formados são selecionados pela razão massa/carga, sendo apresentados em um espectro de massas. O pico de maior intensidade é denominado de pico base, sendo atribuído arbitrariamente para este pico uma intensidade igual a 100. As alturas dos demais picos são fornecidas tomando-se como base à proporção de intensidade em relação ao pico base (SKOOG,2002).

As principais formas de ionização utilizada na espectrometria molecular são: impacto de elétrons (EI), ionização química (CI) e Ionização por campo (FI). Na ionização por impacto de elétrons a amostra é aquecida a uma temperatura suficiente para produzir um vapor molecular, que é então ionizado pelo bombardeio das moléculas resultantes com um feixe de elétrons energéticos. Os elétrons são emitidos de um filamento de tungstênio ou rênio e acelerados por um potencial de aproximadamente 70 eV, estabelecido entre o filamento e o ânodo. As trajetórias dos elétrons e das

moléculas estão em ângulo reto e se interceptam no centro da fonte, onde ocorrem a colisão e a ionização. Os íons positivos produzidos por impacto de elétrons são atraídos através de uma fenda em uma placa aceleradora por uma pequena diferença de potencial, o que faz com que os íons adquiram sua velocidade final antes de entrarem no analisador de massa. Com o espectrômetro ajustado em um valor apropriado de m/z , a corrente iônica é registrada em função do tempo (SKOOG, 2002).

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta parte do trabalho é descrito o resumo de alguns artigos que abordam assuntos relevantes sobre a extração de pesticidas em diversas matrizes, utilizando a extração por dispersão da matriz em fase sólida e à extração líquido-líquido.

Dórea e Sobrinho (2004) analisaram os pesticidas β -endosulfan, parationa metílica e malationa em arroz. O método consistiu em uma amostra de 5,0g, homogeneização com 1,0g de alumina neutra, transferência para uma coluna de polietileno (20 mL) contendo lã de vidro para montar a coluna MSPD, eluição com 40 mL de acetato de etila e a análise por GC/ECD. Foram realizados testes com sílica (1,0 e 0,5g) e alumina neutra (1,0g) como dispersantes e com acetato de etila e hexano misturado com acetato de etila (1:9 v/v) como eluentes. A combinação de alumina neutra como dispersante e acetato de etila eluente mostrou ser mais eficiente no compromisso entre recuperação e limpeza do extrato final. Os resultados de recuperação do método proposto em três níveis de fortificação (0,5 a 10,0 mg.kg⁻¹) para o β -endosulfan, malationa e parationa metílica foram 100,4% \pm 2,2%, 89,3% \pm 2,9% e 100,3% \pm 5,3% respectivamente. O método foi aplicado no monitoramento do arroz do Perímetro Irrigado Betume (SE), não sendo observado traços residual dos pesticidas selecionados para o estudo.

Michel e Buszewski (2004) desenvolveram um método por MSPD para determinação e análise de resíduos de carbendazim em plantas medicinais por HPLC/DAD. A amostra foi triturada, pesando-se 5,0g da mesma que foi homogeneizada com 8,0g de sílica-gel acidificada (10 mL de HCl em 100g de sílica-gel) e transferida para coluna contendo lã de vidro, eluição com 120 mL de uma mistura de metanol-diclorometano (1:5, v/v), concentrado e analisado por HPLC, utilizando uma fase móvel de metanol e água (45:55, v/v). Foi realizado um estudo comparativo entre à clássica extração líquido-líquido e a MSPD. Os dois procedimentos apresentaram os mesmos valores

para os limites de detecção (LOD = 0,02 µg/g) e quantificação (LOQ). O estudo de recuperação em três níveis de fortificação (0,04; 0,08 e 0,1 µg/g) obteve uma recuperação média >71,2% para LLE (R.S.D. 5,2%) e >84,3% para MSPD (R.S.D. 2,7 – 4,1%). A extração LLE demonstra ser eficiente para extrair resíduos de carbendazim em plantas medicinais, porém, apresentou valores menores de recuperação que o método proposto que utilizou a extração por MSPD. A aplicação do procedimento foi demonstrada através do estudo de recuperação que é um parâmetro utilizado na validação de um método analítico.

Dórea e Lopes (2004) analisaram os pesticidas monocrotofós, parationa metílica, cipermetrina-cis, cipermetrina-trans e deltametrina por CGC/MS em amostras de quiabo. Uma porção representativa de 2 g da amostra foi misturada com 4 g de sílica gel (70-230 mesh). Após homogeneização por 2 min a mistura foi transferida para uma coluna MSPD (20mL) contendo 1 cm de alumina neutra como co-coluna e lã de vidro como “base de sustentação”. A eluição dos pesticidas da coluna MSPD foi com 40 mL de acetato de etila. Foram realizados testes com os adsorventes sílica e alumina neutra em várias proporções. Foram feitos também testes de com e sem co-coluna. Os melhores resultados de recuperação foram obtidos utilizando-se sílica gel (70-230 mesh) como dispersante e alumina neutra na co-coluna. Com base nos estudos realizados por Dórea e Lanças (1999), Torres et al (1996) e Navarro et al (2002) o acetato de etila foi selecionado como solvente de eluição. As amostras de quiabo foram fortificadas entre 0,05 e 0,75 mg/Kg. As recuperações médias obtidas para o nível mais elevado de fortificação foram os seguintes: monocrotofós 98,7% (DPR ± 4,2%), parationa metílica 91,4% (DPR ± 5,0%), cipermetrina-cis 93,3% (DPR ± 6,2%), cipermetrina-trans 98,9% (DPR ± 7,6%) e deltametrina 96,1 (DPR ± 10,0%). Os resultados mostraram uma variação entre 0,02 e 0,15 mg/Kg para LOD e 0,1 a 0,7 mg/Kg para LOQ. O método foi aplicado em amostras reais encontrando uma concentração de deltametrina 13 vezes acima que o valor do LMR.

Albero et al (2003), determinaram isômeros de endosulfan e sulfato de endosulfan em amostras comerciais de suco de tomate utilizando extração por MSPD, análise por CG-ECD e confirmação dos pesticidas estudados por GC-MS. O método consistiu em colocar 2,5 g de Florisil em uma coluna de vidro, adicionar 2 mL de suco de tomate e 0,5 mL de acetona para distribuir uniformemente à amostra na coluna, seguido da adição de 1,0 g de Florisil para melhorar a dispersão do suco de tomate no adsorvente. A extração foi realizada com duas porções de 5 mL de acetato de etila, em um banho ultrassônico por 15 min. O extrato obtido foi filtrado, concentrado a 1 mL e depois diluído em n-hexano até 10 mL para posterior análise. Foi avaliado a influência do adsorvente nas recuperações. Florisil foi escolhido por apresentar um extrato mais limpo. Também foi avaliado o melhor solvente (acetato de etila, n-hexano e misturas entre os dois), porém os melhores valores foram obtidos utilizando o acetato de etila puro. Os valores médios das recuperações para um nível de fortificação de 0,1 μg foram: α -endosulfan ($91,0 \pm 2,3$); β -endosulfan ($86,7 \pm 2,0$) e sulfato de endosulfan ($100,6 \pm 6,1$). O método foi aplicado em amostras de sucos adquiridas em supermercados de Madri, encontrando amostras com uma quantidade de resíduos acima dos valores permitidos.

Zuin et al (2003) realizaram um estudo comparativo entre uma metodologia convencional da farmacopéia européia (EP) e uma metodologia desenvolvida por MSPD para analisar resíduos de pesticidas em plantas medicinais brasileiras. Os pesticidas estudados (OC: lindano, hexaclorobenzeno, clorotalonil, tetradifona, α -endosulfan, β -endosulfan, dieldrin, OP: malationa, fenitrotiona, parationa etílica e parationa metílica) foram analisados por GC-ECD. Uma alíquota de 0,5 g de Florisil desativada com 3% de água foi adicionada a 1g de folhas secas e pulverizadas de *Passiflora* L. (maracujá), homogeneizando por 5 min. A mistura foi transferida para uma coluna (5 x 1,5 cm) contendo 2 g de alumina neutra (desativada com 3% de água) e 0,5 g de sulfato de sódio anidro. A eluição foi feita com 5 mL de uma mistura de n-hexano e acetato de etila (70:30, v/v). Foram realizados testes para seleção da fase sólida adsorvente (C_8 ,

C₁₈, Florisil), solvente de eluição (acetato de etila e n-hexano) e fase sólida para a etapa de limpeza do extrato. As soluções padrões foram preparadas no extrato para obter a curva analítica, evitando influência da matriz nos resultados. O estudo de recuperação foi feito considerando três níveis de fortificação, obtendo valores médios de recuperações de 96,31% (EP) e 94,27% (MSPD). O método desenvolvido apresentou valores equivalentes ao da farmacopéia europeia com a vantagem de ser de baixo custo, simples e rápido.

Navarro et al (2002) realizaram um estudo comparativo entre à extração líquido-líquido (método já estabelecido) e MSPD para determinação de oito fungicidas (captan, carboxin, fludioxonil, flutolanil, folpet, pirimetanil, quintozole e tebuconazol) em frutas e vegetais. O método por MSPD consistiu em uma amostra de 0,5g, homogeneização com 0,5g de C₁₈, transferência para uma coluna contendo 1 g de sílica, eluição com 10 mL de acetato de etila e a análise por GC-NPD-ECD conectado em paralelo com MSD para confirmação. Obtendo uma recuperação entre 80 e 102% ±9% para o conjunto dos oitos fungicidas em três níveis de concentração. No estudo comparativo foram avaliados os parâmetros: linearidade, recuperações e limite de quantificação (LOQ). O método por MSPD apresentou valores satisfatórios de recuperações e concordante com o método já estabelecido, com a vantagem de obter um extrato mais limpo e usar uma massa menor da amostra, tendo como consequência, uma menor quantidade de compostos oriundos da matriz por mL de extrato final.

GOBO et al (2004) realizaram um estudo visando o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para determinação de resíduos de pesticidas organofosforados em tomates. Os pesticidas organofosforados selecionados para o estudo foram: acefato, clorpirifós, malationa, metamidofós e parationa metilica empregando cromatografia gasosa com detector de nitrogênio e fósforo (GC-NPD). O procedimento de extração empregado neste estudo foi baseado na extração líquido-líquido (LLE) e consistiu em: uma amostra de tomate foi homogeneizada em liquidificador, então, 25 g da amostra foi pesada em um frasco com tampa, adicionando-se

em seguida 50 mL de acetato de etila e 2,5 mL de uma solução de cloreto de sódio a 10%. Em seguida, o frasco foi agitado por 25 minutos. Após agitação foi adicionado mais 35 g de sulfato de sódio anidro e a mistura foi agitada por mais 10 minutos. Após 5 minutos de repouso, retirou-se uma alíquota que foi submetida à análise. Neste estudo, também foi observado à interferência de compostos endógenos sobre os resultados de recuperação. A curva analítica foi construída com soluções dos pesticidas no extrato da matriz. Os valores de recuperação variaram de $88 \% \pm 3,0$ a $117\% \pm 20,0$.

Gambacorta et al (2004) realizaram um estudo para avaliar a concentração de resíduos dos pesticidas metomil, benalaxil e clorotalonil em tomate após aplicação destes compostos. No estudo foi feito o monitoramento da concentração dos resíduos durante 20 dias após o tratamento. Para o benalaxil a concentração no momento da aplicação ao vigésimo dia, ocorreu uma redução de $0,76 \pm 0,14$ para $0,13 \pm 0,02 \text{ mg.kg}^{-1}$, para o clorotalonil ocorreu uma redução de $6,32 \pm 0,59$ para $0,65 \pm 0,07 \text{ mg.kg}^{-1}$ e para o metomil a redução foi de $1,54 \pm 0,15$ para $0,005 \pm 0,002 \text{ mg.kg}^{-1}$ após o sétimo dia. A extração dos pesticidas da matriz foi feita através da extração líquido-líquido, partindo de 25 g da amostra e utilizando 50 mL de éter de petróleo e 2 g de sulfato de sódio anidro, seguido de duas novas extrações com 25 ml de diclorometano. O extrato foi concentrado e dissolvido novamente em diclorometano, sendo submetido em seguida a um clean-up através de um cartucho de Florisil ativado com 4 mL de uma mistura de acetonitrila e diclorometano (1:4 v/v). A eluição foi realizada com 6 mL da mistura usada na ativação. O extrato foi analisado por HPLC (metomil) e GC (benalaxil e clorotalonil).

Rastrelli et al (2002) analisaram resíduos de dezoito pesticidas organofosforados em óleo de oliva por cromatografia gasosa. Uma alíquota de 6 g da amostra de óleo foi misturada com 10 mL de n-hexano, obtendo 3 ml de uma solução lipofílica, passando este por um cartucho de sílica-gel conectado com outro cartucho de C₁₈. Após 10 minutos o extrato lipofílico foi eluído por gravidade com 5 mL de acetonitrila saturado com hexano. O eluato foi misturado com 4 mL de metanol e a mistura foi concentrada. O extrato obtido foi avolumado até 1 mL em acetona e analisado por GC-NPD.

O estudo de recuperação foi realizado em três níveis de fortificação obtendo valores que variaram de 82 ± 12 a 108 ± 9 % (fortificação de $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$), de 82 ± 8 a 110 ± 8 % (fortificação de $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$) e de 83 ± 9 a 110 ± 4 % (fortificação de $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$). Amostras reais (65) foram analisadas, encontrando-se resíduos de dimetoato em 29 amostras, fention em 18 amostras e clorpirifós-metil e azinfos-etil em 4 amostras. Os demais compostos não foram detectados em nenhuma amostra.

Sannino et al (2004) utilizaram a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (ionização por eletrospray) para a determinação de uma nova geração de pesticidas (azoxistrobin, trifloxistrobin, kresoxim-metil, fenazaquin, indoxacard, fenotiocarb, benfuracarb, imidacloprid, dimetomorf, fenpiroximate, hexitiazox, tebufenpirad, tebufenozide, difeconazole, fenbuconazole, flusilazole, paclobutrazol, tebuconazol, tetraconazol, bromoconazol, etofenprox, fenexamid e piridaben) usados no processamento industrial de frutas e vegetais (purê de maçã, suco de limão e purê de tomate). Foram analisados 24 pesticidas pertencentes a diferentes funções químicas. Inicialmente uma amostra de 20 g de suco de limão foi homogeneizada e o pH foi ajustado para 6,0 através da adição de NaOH 10M. Uma amostra adicional de 10,0 g de suco de limão foi utilizada, sendo necessário ajustar outra vez o pH. Um volume de 40 mL de acetona e 7 g de cloreto de sódio foram adicionados e a mistura foi homogeneizada por 2 minutos. Uma mistura de 20 ml de acetato de etila e ciclohexano (50:50, v/v) foi adicionada e a mistura foi agitada por mais 1 minuto. Foram retirados 50 mL da fase orgânica, a qual foi filtrada. Em seguida, foram adicionados mais 20 g de sulfato de sódio e a mistura foi outra vez filtrada. O filtro foi lavado com 20 mL de acetato de etila-ciclohexano (50:50 v/v), o material foi obtido dentro de um frasco e concentrado. A amostra foi então avolumada para 9 mL com acetona-hexano (15:85 v/v). Uma alíquota de 1 mL desta solução foi evaporada e o resíduo foi avolumado para 1 mL com acetonitrila-água (40:60 v/v). Este extrato foi analisado por HPLC-MS. Os valores de recuperação para o conjunto de pesticidas em matriz de purê de tomate variaram de $76\% \pm 13\%$ a $106\% \pm 2\%$. Foi observada também a influência da matriz de

tomate nos resultados de recuperação (>135%). Este efeito foi compensado pela utilização dos analitos preparados no extrato da matriz.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 – Materiais

Béquer (50 e 250mL), bastão de vidro, proveta (10 a 50mL), balão volumétrico (1, 2, 5, 10 e 25 mL), balão de fundo redondo, vidro de relógio, espátula, pinça, seringa de polietileno (20mL), lã de vidro (sem tratamento prévio), garra, micropipeta (Boeco Pipette 10-100 e 100-1000 μ L), pipeta Pasteur, rota-evaporador (Fisatom 802D), balança analítica (Sartorius BL 2105), seringa para injeção das amostras no CG (Hemilton 701N – 10 μ L).

6.2 – Reagentes e adsorventes

Acetato de etila (Merck, Darmstadt, Alemanha), hexano (Quimex, Brasil), diclorometano (Merck, Darmstadt, Alemanha), Florisil 60-100 mesh (Sigma, U.S.A), sílica gel 70-230 mesh (Merck, Darmstadt, Alemanha), alumina neutra 70-290 mesh (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), C₁₈ 50 μ M-65 A° (Waters- U.S.A) e sulfato de sódio anidro (Merck, Darmstadt, Alemanha). Todos os solventes e reagentes utilizados possuíam grau de pureza maior ou igual a 96%.

6.3 – Padrões e soluções

Os padrões certificados dos pesticidas utilizados foram: dimetoato (Pestanal, 99,8%), parationa metílica (Institute of Organic Industrial Chemistry, Warsaw, Polônia, 99,4%), malationa (Radian International, 99%),

tebuconazol (Dr. Ehrenstorfer, 98,5%), cipermetrina (Institute of Organic Industrial Chemistry, Warsaw, Polônia, 99%).

As soluções padrão estoques foram preparadas com concentrações de 450 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (dimetoato), 440 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (parationa metílica), 430 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (malationa), 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (tebuconazol) e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (cipermetrina) em acetato de etila e foram armazenadas em freezer. A partir destas foram preparadas soluções padrão de trabalho em diclorometano com concentrações de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada pesticida. As soluções de trabalho também foram armazenadas no freezer e utilizadas no máximo por quatro semanas, em função da sua degradação.

6.4 – Limpeza dos materiais

Os materiais utilizados na preparação das soluções e durante as extrações foram lavados seguindo o seguinte procedimento:

- Enxágüe em água corrente, por três vezes;
- Lavagem com solução de extran a 2%;
- Enxágüe em água corrente, por três vezes;
- Lavagem com água destilada;
- Enxágüe com acetona e secagem;
- Cobrir com papel alumínio as extremidades abertas e guardar em armários fechados.

6.5 – Condições cromatográficas de análise por GC-MS

O GC-MS da Shimadzu, modelo QP5050A, Kyoto, Japão, foi utilizado nas análises dos pesticidas em matriz de tomate durante a otimização de parâmetros para o desenvolvimento do método. Equipado com injetor com e sem divisão de fluxo, operando no modo sem divisão por 1 min, a 250°C,

coluna DB - 5 - 5% fenil, 95% polisiloxano (30m x 0,25mm de diâmetro x 0,25µm) J & W Scientific, com programação de temperatura: temperatura inicial, 60°C (1 min); taxa de aquecimento de 25°C/min até 180°C; taxa de aquecimento de 15°C/min até 280°C (10 min). Temperatura da interface, 280°C. O gás de arraste foi o hélio com fluxo de 1,2 mL.min⁻¹ (13,4 kPa). Injeção manual de 1 µL. O espectrômetro de massas foi operado com monitoramento de íons selecionados (SIM). Modo ionização: impacto de elétrons a 70 eV (280°C). Os fragmentos selecionados no modo SCAN para os pesticidas estudados foram (m/z): 87 e 125 para o dimetoato; 109 e 125 para a parationa metílica; 93,127 e 173 para a malationa; 70 e 125 para o tebuconazol, e 181 e 207 para a cipermetrina.

O GC-MS da Shimadzu, modelo QP2010, Kyoto, Japão, foi utilizado nas análises dos extratos fortificados com os pesticidas e nas análises dos extratos das amostras reais, que foram realizadas no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Química no Instituto de Química da UFBA. Equipado com injetor automático (modelo AOC 20i) e coluna HP 5MS – 5% fenil, 95% polisiloxano (30 m x 0,25 mm de diâmetro x 0,25µm). As demais condições de análise foram as utilizadas no equipamento QP5050A.

6.6 – Processo de dispersão da matriz em fase sólida.

6.6.1 – Preparação da amostra

Amostras de tomate não contaminadas (testemunha), adquiridas na feira de produtos orgânicos no Clube dos Engenheiros Agrônomos de Sergipe (Aracaju/SE), foram utilizadas para desenvolver a metodologia por dispersão da matriz em fase sólida. Os tomates selecionados como “testemunhas”, logo após o recebimento, foram processados sem lavar na sua forma *in natura* (casca, semente e polpa) em liquidificador e armazenados em frascos com tampa rosqueável em freezer. Momentos

antes da extração, o tomate processado foi retirado do freezer e deixados à temperatura ambiente até descongelar.

6.6.2 – Método de extração por MSPD

A extração dos pesticidas selecionados para o estudo em matriz de tomate, fazendo uso da técnica de dispersão da matriz em fase sólida, consiste em homogeneizar 2,0 g do tomate fortificado com 0,5 g de alumina neutra por aproximadamente 2 minutos até obter uma massa uniforme. Transferir para uma coluna MSPD preparada no laboratório minutos antes da extração e previamente condicionada. A coluna é preparada em uma seringa de polietileno com 20 mL de capacidade, colocando-se lã de vidro como base de sustentação, adicionando em seguida 0,5g de Florisil (co-coluna) e sobre este, 3,0 g de sulfato de sódio anidro. A coluna preparada é condicionada passando-se 5 mL de diclorometano. Em seguida, a mistura da matriz com o adsorvente (alumina neutra) é transferida para a coluna e distribuída uniformemente. A eluição é feita com fluxo gravitacional de 20 mL de diclorometano. O eluato obtido é concentrado por evaporação do solvente em rota-evaporador (65 kPa, 45°C) e uma alíquota de 1 μ L é analisado por cromatografia em fase gasosa. A Figura 7 apresenta o esquema de montagem da coluna de MSPD utilizada para extrair os pesticidas selecionados da matriz de tomate.

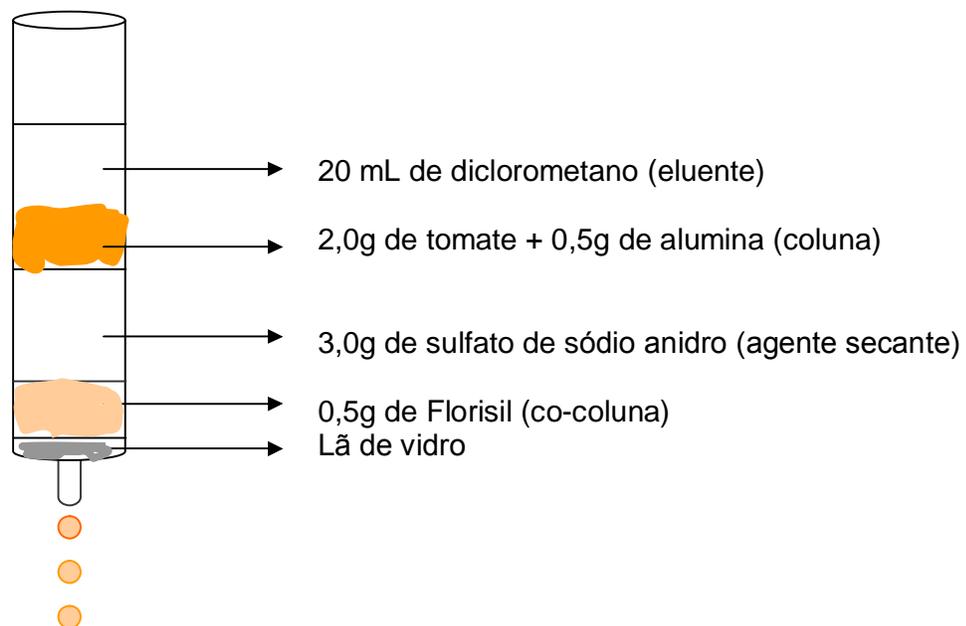


FIGURA 7: Esquema de montagem da coluna MSPD para extração de pesticidas de tomate.

A Figura 8 apresenta o procedimento utilizado para a extração de pesticidas por dispersão da matriz em fase sólida de amostras fortificadas de tomate.

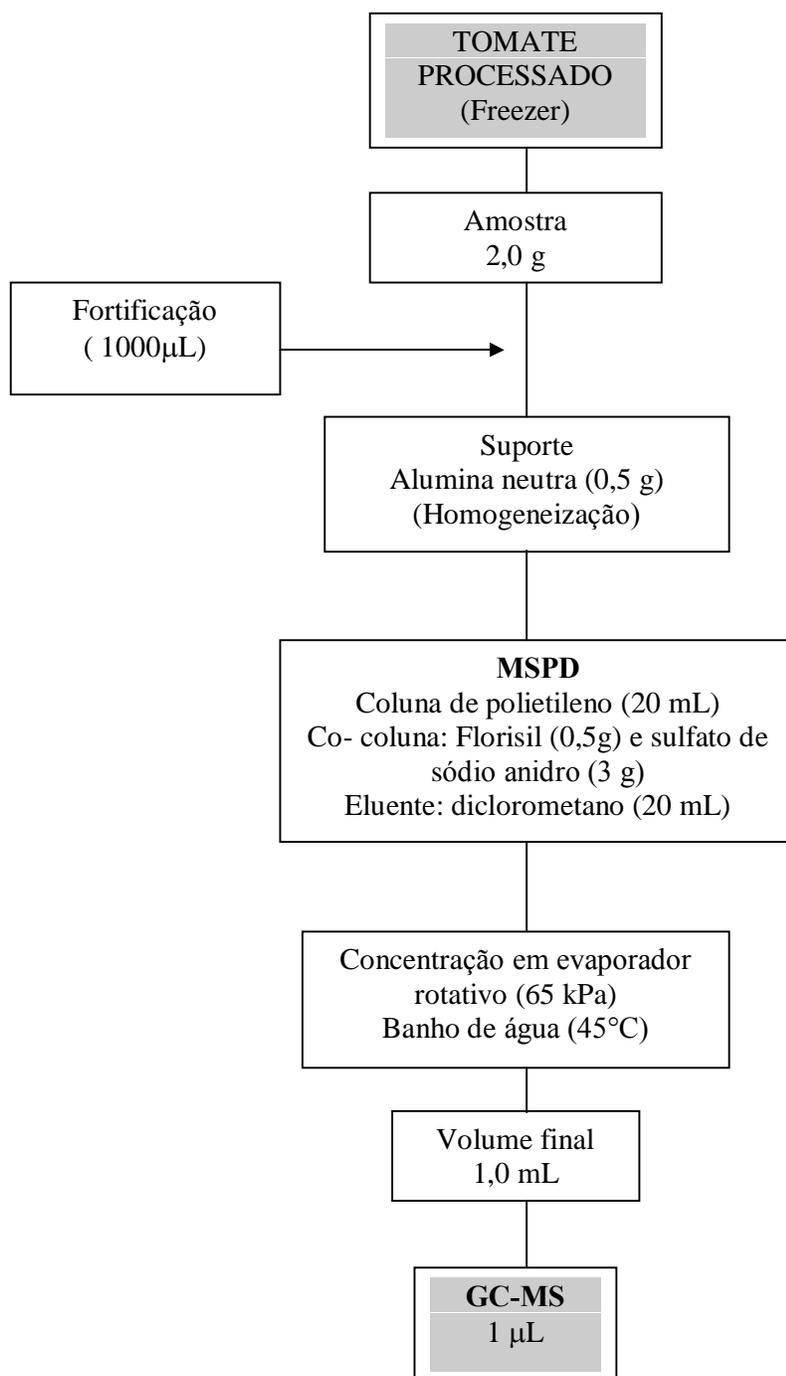


FIGURA 8: Procedimento para a extração de pesticidas por dispersão da matriz em fase sólida de amostras de tomate.

Quatro amostras comerciais de 1,0kg de tomate foram coletadas na 1ª semana de março de 2005. As amostras foram adquiridas nos seguintes pontos comerciais na cidade de Aracaju: Bompreço (Av. Saneamento), G Barbosa (Av. Rio de Janeiro), Mercado central de Aracaju e na feira livre do bairro Suíça. As amostras de tomates coletadas e etiquetadas foram condicionadas em sacos de polietileno e preservadas em gelo para o transporte ao laboratório. No laboratório, após o recebimento das amostras, as mesmas foram identificadas e previamente picadas com faca de aço inoxidável e processadas em liquidificador sem lavar, na sua forma *in natura* (casca, semente e polpa). O homogeneizado foi então acondicionado em frascos com tampa rosqueável e mantido em freezer até análise.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento da metodologia analítica foram otimizados as condições cromatográficas para uma boa separação dos analitos, seguido de experimentos para a seleção do eluente, suporte adsorvente, volume de eluição, melhor proporção matriz/adsorvente (em massa) e limpeza do extrato. Com base nos valores de recuperação que foram obtidos foi realizada uma discussão sobre a repetitividade do método, limite de quantificação, limite de detecção e linearidade. Finalizando, foi realizada uma discussão sobre as análises nas amostras reais.

7.1 – Otimização das condições cromatográficas.

A partir de trabalhos realizados no próprio laboratório em estudos anteriores com alguns destes pesticidas e de dados bibliográficos obtidos em artigos científicos foi feita a primeira programação de temperatura da coluna para dar início ao trabalho. Inicialmente foram realizadas injeções em separado de 1 μ L de cada padrão de pesticida com concentração de 10 μ g/mL, no sistema de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas operando no modo SCAN (varredura). Várias programações de temperatura para a coluna foram testadas, a fim de obter uma programação de temperatura satisfatória para uma separação adequada dos cinco pesticidas selecionados. Durante estas injeções foi mantido constante o fluxo da fase móvel e a velocidade linear dos analitos na coluna cromatográfica.

Após a identificação de cada composto utilizando a programação de temperatura otimizada, foi feita uma injeção de uma solução contendo o conjunto de pesticidas selecionados para o estudo, com o objetivo de confirmar os tempos de retenção e separação dos compostos. Em seguida, foram feitas algumas variações na velocidade linear dos analitos com o

objetivo de diminuir o tempo total da corrida. A programação de temperatura que possibilitou uma separação adequada dos analitos está descrita no item 6.5. A velocidade linear do sistema cromatográfico foi de $1,2 \text{ cm.s}^{-1}$.

Após o estabelecimento da programação de temperatura ideal, foi feita uma seleção dos íons de maior intensidade para cada analito no modo SCAN (varredura), os quais estão relacionados na Tabela 9. Com o espectrômetro de massas operando no modo SIM (Monitoramento de íons selecionados), foram realizadas injeções de uma solução cumulativa dos pesticidas para identificar quais fragmentos apresentavam melhor resposta no espectrômetro de massas. A Figura 9 mostra o cromatograma de uma mistura de padrões em solução de concentração $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

TABELA 9: Fragmentos monitorados na quantificação dos pesticidas

| Pesticida | Tempo de retenção (min) | Fragmentos (m/z) |
|--------------------|-------------------------|------------------|
| Dimetoato | 11,42 | 87*; 125 |
| Parationa metílica | 12,59 | 109; 125* |
| Malationa | 12,92 | 93; 127*; 173 |
| Tebuconazol | 16,31 | 70*; 125 |
| Cipermetrina (cis) | 21,77 | 181*; 207 |

* Íon base

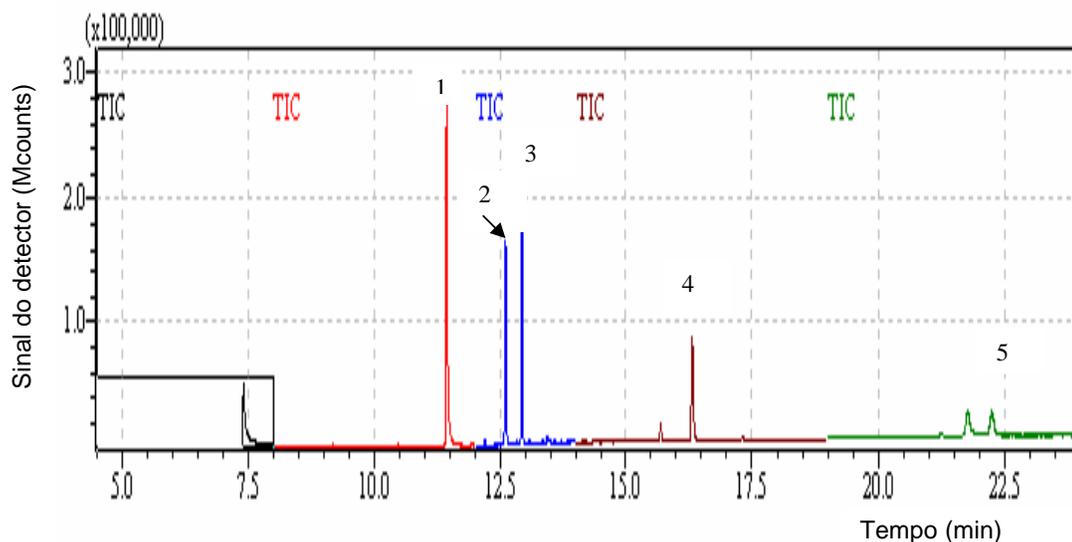


FIGURA 9: Cromatograma obtido por GC/MS (modo SIM) de solução cumulativa de pesticidas com concentração de $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. 1. Dimetoato; 2. Parationa metílica; 3. Malationa; 4. Tebuconazol e 5. Cipermetrina (cis). Ver condições cromatográficas de análise no item 6.5.

7.2 – Seleção do eluente

Partindo de dados obtidos na literatura, foi observado que o solvente mais utilizado na etapa de eluição dos analitos é o acetato de etila e que outros solventes como o diclorometano, acetonitrila e hexano são menos utilizados. Para a seleção do eluente mais adequado foram realizadas extrações dos pesticidas da matriz de tomate utilizando C_{18} como adsorvente, mantendo o mesmo volume do eluente e a mesma proporção matriz/adsorvente (3:1), variando apenas o tipo de eluente. Os solventes testados foram o hexano, acetato de etila, diclorometano e duas misturas de hexano e acetato de etila nas proporções em volume de 1:1 e 1:3 v/v. Para a

escolha destes solventes foi levado em consideração as polaridades dos analitos e dos solventes. O volume de cada solvente ou mistura entre eles utilizado na eluição dos analitos foi de 20,0 mL. Foi também realizada uma extração utilizando apenas o acetato de etila sem a presença do C₁₈. Este teste foi realizado com a finalidade de verificar se existiria alguma diferença na extração realizada com e sem o C₁₈, uma vez que os testes preliminares mostravam uma ineficiência deste adsorvente na extração. As amostras testemunhas de tomates foram contaminadas com uma adição padrão de 1,0 mL de solução cumulativa com concentração de 1,0 mg.L⁻¹ de cada pesticida. Os testes foram realizados em replicatas com duas extrações para cada eluente ou mistura entre eles. Foram feitas duas injeções para cada extrato obtido. Os resultados das recuperações mostrados na Tabela 10 foram calculados a partir de uma curva analítica construída antes de identificar o efeito da matriz nas análises. A Tabela 10 mostra a média das recuperações para cada extração realizada com os diferentes sistemas de eluição testados para extração dos pesticidas.

TABELA 10 – Teste para escolha do solvente de eluição tendo o C₁₈ como adsorvente.

| Pesticida | Recuperação (%) | | | | | |
|--------------------|---------------------------------|-------|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| | Solvente e mistura de solventes | | | | | |
| | Hex | AcOEt | DCM | Hex+AcOEt (50:50; v/v) | Hex+AcOEt (25:75; v/v) | AcOEt (sem C ₁₈) |
| Dimetoato | 35,7 | 53,3 | 74,1 | 60,5 | 34,2 | 62,6 |
| Parationa metílica | 120,7 | 90,8 | 154,8 | 104,2 | 67,0 | 109,2 |
| Malationa | 57 | 45,1 | 71,5 | 51,7 | 30,0 | 44,8 |
| Tebuconazol | 51,7 | 63,7 | 115,2 | 67,3 | 26,2 | 53,1 |
| Cipermetrina (cis) | 109,9 | 149,3 | 305,7 | 156,4 | 45,1 | 125,1 |

Para o dimetoato, malationa e o tebuconazol o solvente que apresentou maior eficiência na extração foi o diclorometano, porém, as recuperações obtidas para a cipermetrina (cis) foram bastante elevadas, evidenciando o efeito matriz neste pesticida. Uma discussão sobre a

influência da matriz será feita no item 7.5 deste trabalho. Para a cipermetrina (cis) o solvente que apresentou melhor resultado nas extrações foi o hexano e para a parationa metílica o acetato de etila foi o solvente que apresentou o melhor resultado. A mistura de hexano e AcOEt (50:50) apresentou um valor de recuperação pouco satisfatório, porém, a mistura (25:75) para hexano e acetato de etila apresentou valor de recuperação fora da faixa aceitável de recuperação descrita por RIBANI et al (2004) para análises cromatográficas, que corresponde a valores entre 70 e 120%.

Um outro estudo foi a extração realizada sem a presença do C₁₈. Comparando os valores das recuperações que foram obtidos utilizando o acetato de etila com o C₁₈ e com o acetato de etila sem o C₁₈, nota-se que os valores obtidos são bastante semelhantes, mostrando que o C₁₈ não atuou bem como adsorvente, seja pela quantidade do adsorvente que pode ser insuficiente ou pela própria natureza do material. Novos testes com o C₁₈ foram realizados para a escolha do melhor adsorvente, que será discutido no item 7.3.

Novos testes foram realizados utilizando o acetato de etila e o diclorometano como solventes nas extrações. Substituindo o C₁₈ por Florisil e mantendo as outras condições, foram obtidos os seguintes valores de recuperação, apresentados na Tabela 11.

TABELA 11: Teste para escolha do solvente de eluição tendo Florisil como adsorvente.

| Pesticida | Concentração (mg.L ⁻¹) | Recuperação (%) | |
|--------------------|---------------------------------------|---------------------|---------------|
| | | Solvente de eluição | |
| | | Acetato de etila | Diclorometano |
| Dimetoato | 1,0 | 41,60 | 65,40 |
| Parationa metílica | 1,0 | 69,60 | 138,30 |
| Malationa | 1,0 | 35,70 | 46,40 |
| Tebuconazol | 1,0 | 39,70 | 95,60 |
| Cipermetrina (cis) | 1,0 | 79,75 | 279,40 |

Para o dimetoato, parationa metílica, malationa e o tebuconazol o diclorometano tem se mostrado mais eficiente como eluente, porém, mais uma vez é possível notar o efeito matriz na cipermetrina (cis) de forma bastante acentuada com a eluição utilizando o diclorometano.

Com base nos cromatogramas obtidos de amostras fortificadas de tomate (observar as Figuras 10 e 11) foi observado que o diclorometano fornece um cromatograma mais limpo, ou seja, a quantidade de compostos endógenos arrastados pelo diclorometano é bem menor que os demais. Este fato é importante, pois a quantidade de interferentes será menor, favorecendo a quantificação dos analitos. A presença de compostos da matriz no extrato final pode interferir na quantificação dos analitos, quando estes possuírem tempo de retenção iguais ou muito próximos aos dos analitos. Como o diclorometano também foi o solvente que apresentou valores de recuperações satisfatórios para uma maior quantidade de analitos, este solvente foi escolhido como eluente para o estudo e otimização dos demais parâmetros.

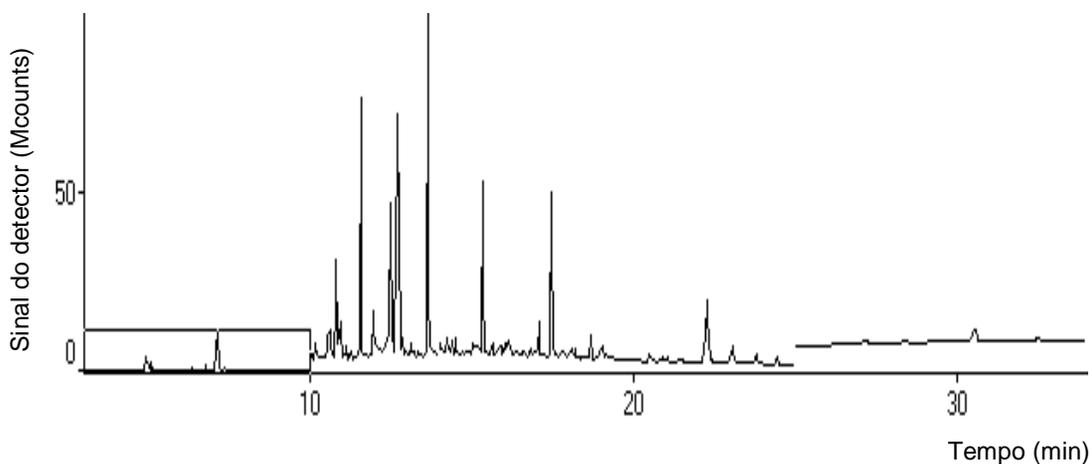


FIGURA 10: Cromatograma obtido por GC-MS (SIM) de um extrato de tomate fortificado, obtido através de extração realizada com C₁₈ e diclorometano. Para condições cromatográficas de análises, ver item 6.5.

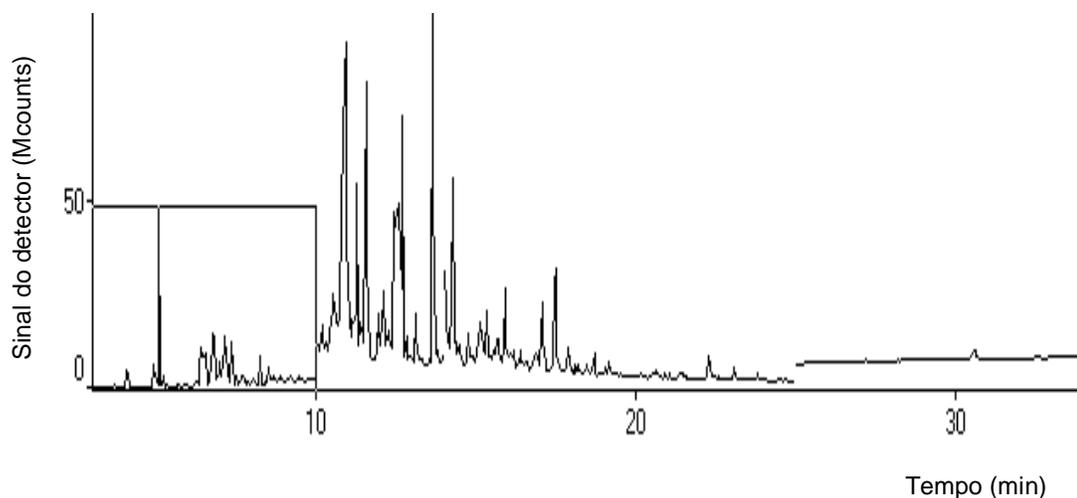


FIGURA 11: Cromatograma obtido por GC-MS (SIM) de um extrato de tomate fortificado, obtido através de extração realizada com C₁₈ e acetato de etila. Para condições cromatográficas de análises, ver item 6.5.

7.3 – Seleção do adsorvente (Suporte)

Os adsorventes testados foram: C₁₈, Florisil, sílica e alumina neutra. O C₁₈ utilizado foi retirado diretamente de um cartucho SPE sem qualquer condicionamento prévio no momento da mistura com a matriz. A sílica utilizada nos testes foi ativada a 80°C por 2 horas e estocada em dessecador até a sua utilização por no máximo uma semana. O Florisil e alumina neutra foram utilizadas sem qualquer tratamento ou ativação prévia. As extrações foram realizadas utilizando 20 mL de diclorometano como eluente, mantendo a mesma proporção matriz/adsorvente (3:1). Os resultados obtidos das recuperações são demonstrados na Tabela 12. As extrações foram realizadas em replicatas, com três extrações para cada adsorvente testado e com uma injeção para cada extrato. Estes valores de

recuperação foram calculados com a curva analítica construída com as soluções padrão preparadas em diclorometano.

TABELA 12: Teste para escolha do adsorvente (suporte) para extração por MSPD tendo DCM como solvente de eluição.

| Pesticida | Concentração (mg.L ⁻¹) | Recuperação (%) | | | |
|--------------------|---------------------------------------|-----------------|----------|--------|---------|
| | | C ₁₈ | Florisil | Sílica | Alumina |
| Dimetoato | 1,0 | 205,9 | 101,2 | 138,6 | 119,7 |
| Parationa metílica | 1,0 | 231,6 | 110,2 | 135,3 | 107,2 |
| Malationa | 1,0 | 276,3 | 190,9 | 219,0 | 145,5 |
| Tebuconazol | 1,0 | 420,7 | 217,9 | 288,4 | 251,9 |
| Cipermetrina (cis) | 1,0 | 402,4 | 241,0 | 139,6 | 118,9 |

Com o C₁₈ foram obtidos os maiores valores de recuperação em porcentagem para os cinco pesticidas, variando de 231,6 % a 420,7%. O efeito matriz neste adsorvente foi mais acentuado que nos demais adsorventes. O C₁₈ foi considerado inadequado para extrair este conjunto de analitos, pois, o extrato obtido com o C₁₈ e diclorometano fornece um cromatograma com vários picos. Estes picos são de compostos endógenos provenientes da matriz, interferindo na quantificação dos analitos por apresentarem tempo de retenção muito próximo dos analitos de interesse.

A sílica apresentou resultados semelhantes ao C-18, porém, o efeito matriz foi menos acentuado. A utilização da sílica como adsorvente na extração deste conjunto de analitos também foi considerado inadequado, por ser um material de forte caráter polar, este adsorvente retém uma grande quantidade de compostos endógenos polares provenientes da matriz. O extrato obtido fornece um cromatograma “sujo”, ou seja, apresenta vários picos de compostos oriundos da matriz dificultando a quantificação dos analitos.

O Florisil apresentou melhores valores de recuperação para o dimetoato e o tebuconazol. O extrato obtido utilizando Florisil como adsorvente, forneceu um cromatograma mais limpo, ou seja, com uma menor quantidade de compostos provenientes da matriz, minimizando a influência do efeito matriz. O extrato obtido utilizando alumina como adsorvente, forneceu um cromatograma limpo, indicando a presença de poucos interferentes.

Com alumina foram obtidos os melhores valores de recuperações para a parationa metilica, malationa e a cipermetrina. Para o dimetoato e o tebuconazol, os valores obtidos utilizando alumina foram inferiores que os valores obtidos com a Florisil. Como a alumina apresentou valores mais satisfatórios para o maior número de analitos e para os demais analitos valores próximos aos obtidos com a Florisil para o dimetoato e o tebuconazol, a alumina foi escolhida como o melhor adsorvente na extração deste conjunto de analitos da matriz.

7.4 – Efeito da matriz.

Um dos problemas na análise de resíduos de pesticidas é o erro por excesso. Este fenômeno é atribuído ao chamado efeito da matriz, que é explicado por uma elevada transferência de analitos do injetor para a coluna cromatográfica, também como um resultado da presença no extrato de substâncias auxiliares arrastadas da matriz durante a extração dos analitos ou por um efeito protetor no injetor provocado por estas substâncias (BERNAL, 1997). O efeito da matriz ocorre em colunas de cromatografia em fase gasosa e em fase líquida, quando repetidas injeções da amostra formam uma “crosta” dos componentes da amostra na cabeça da coluna e introduz uma nova “fase” na coluna que afeta o caráter da eluição e retenção dos analitos em contato com esta “fase”. A descontinuidade desta fase com a fase da coluna analítica produz alargamento de picos, “ombros” ao lado do

pico ou picos múltiplos para um único analito, assim como pode provocar perdas do analito (DÓREA, 1999).

A Figura 12 mostra a diferença entre o sinal (Área) de um mesmo analito (cipermetrina-cis) para um mesmo valor de concentração, quando a solução do pesticida é preparada em solvente puro e no extrato de tomate. É possível observar que a inclinação da curva obtida com a solução padrão do analito preparado no extrato da matriz é maior que o da curva construída com a solução padrão do analito preparado no solvente puro (diclorometano). Quanto maior o ângulo de inclinação na curva analítica, maior é a sensibilidade, mostrando que ocorre um aumento na sensibilidade do método, que irá induzir a um erro por excesso.

Como a resposta do analito em uma solução padrão preparada no extrato da matriz é maior, a utilização da curva de calibração construída com os padrões dos analitos preparados no extrato da matriz pode eliminar ou reduzir a influência da matriz por compensação. Outra possibilidade para reduzir a influência da matriz é aumentar a eficiência e seletividade no procedimento de extração ou uma limpeza mais extensiva do extrato (ZROSTLÍKOVÁ, 2002). Entretanto, esta última alternativa pode ocasionar um aumento no tempo de extração e redução no valores de recuperação em função das sucessivas etapas de clean-up ou purificação para limpeza do extrato, que pode provocar interações entre os analitos e o adsorvente de limpeza, difíceis de serem rompidas no momento da eluição (FERREIRA et al, 1993)

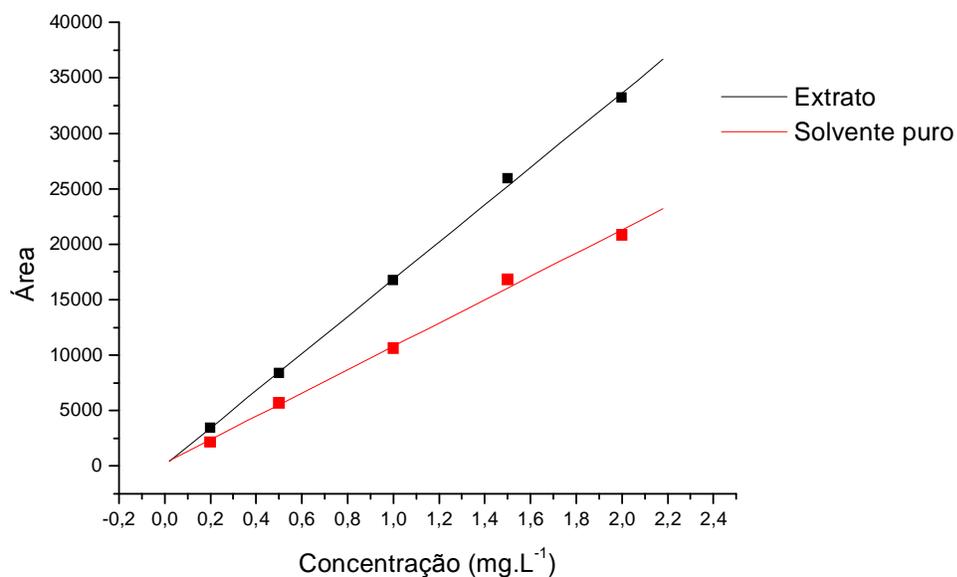


FIGURA 12 – Comparação entre as curvas analíticas da solução padrão de cipermetrina (cis) preparada no solvente puro (diclorometano) e no extrato da matriz de tomate.

7.5 – Escolha da proporção matriz/adsorvente.

A matriz deve estar dispersa no adsorvente formando uma mistura uniforme, a fim do adsorvente romper a estrutura da matriz e interagir com os analitos, extraíndo-os da matriz. Não existe uma proporção definida entre a quantidade de matriz e quantidade de adsorvente para ser aplicada na extração por dispersão da matriz em fase sólida. A melhor proporção em massa entre a matriz e o adsorvente deve ser determinado experimentalmente durante o desenvolvimento da metodologia analítica, pois, esta proporção varia em função do tipo de analito e da natureza da matriz.

Por exemplo na determinação de resíduos de pesticidas em frutas e hortaliças utilizando a extração por MSPD, Navarro et al (2002) utilizaram 0,5 g da matriz e 0,5 g de adsorvente, ou seja, uma proporção de 1:1. Usando a mesma técnica de extração para isolar resíduos de pesticidas em plantas medicinais, Zuin et al (2003) utilizaram 1 g da matriz e 0,5 g do adsorvente, ou seja, uma proporção de 2:1. Por esta razão, tomando como base estudos descritos na literatura com outras matrizes, foi realizado um estudo comparativo com cinco proporções diferentes, utilizando sempre dois gramas do tomate, variando apenas a massa do adsorvente. As proporções testadas foram as seguintes: 5:1; 4:1; 2:1; 1:1; 1:2. Os resultados obtidos para as recuperações são demonstrados na Figura 13.

Foi observado que para as extrações realizadas com as proporções 4:1; 2:1; 1:1 e 1:2, para o dimetoato, tebuconazol e a cipermetrina (cis) ocorre um aumento das porcentagens de recuperação com o aumento da quantidade de adsorvente na mistura. O aumento de adsorvente favorece a extração de compostos endógenos da matriz que interferem na quantificação dos analitos, evidenciando a influência da matriz na quantificação destes analitos.

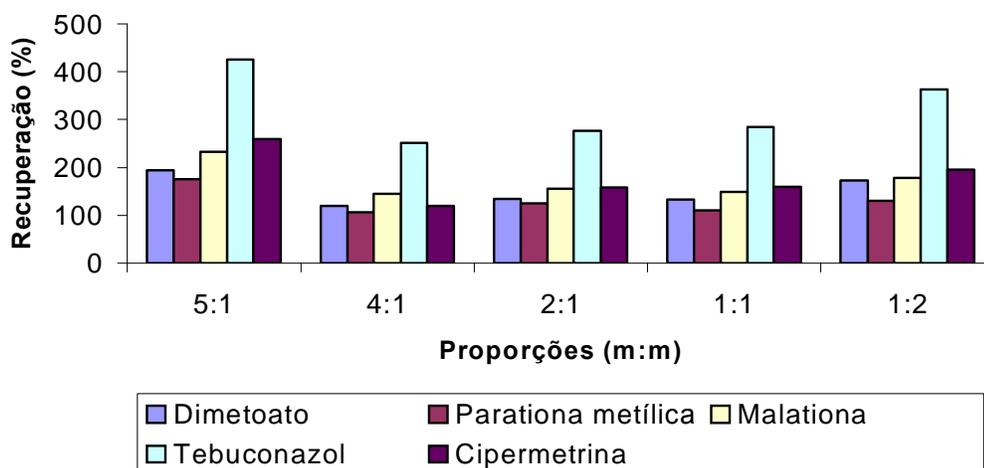


FIGURA 13 – Teste para a escolha da proporção matriz:adsorvente tendo DCM como solvente de eluição e alumina como suporte.

Para a parationa metilica e a malationa as proporções 4:1 e 1:1 apresentaram valores semelhantes, porém para as outras duas proporções ocorre um aumento das porcentagens de recuperação com o aumento de adsorvente na mistura de forma semelhante ao descrito para o dimetoato, tebuconazol e a cipermetrina (cis).

A extração realizada com a proporção 5:1 apresentou comportamento diferente ao que foi exposto acima, ou seja, mesmo utilizando uma quantidade menor de adsorvente foram obtidos os maiores valores de recuperações para todos os analitos.

Considerando-se os valores obtidos para o conjunto dos cinco pesticidas em estudo, a proporção 4:1 foi a que apresentou os valores mais satisfatórios. Os compostos dimetoato, parationa metilica e cipermetrina apresentaram valores dentro de uma faixa aceitável para a validação do método, apenas a malationa e o tebuconazol apresentaram valores acima dos 120% para as suas recuperações, evidenciando a necessidade de fazer uma limpeza do extrato, a fim de eliminar prováveis compostos interferentes sobre estes analitos.

7.6 – Limpeza do extrato com uma co-coluna (Clean-up)

Foram realizados três experimentos utilizando um segundo adsorvente como co-coluna na extração por MSPD. A utilização da co-coluna tem como objetivo reter compostos endógenos extraídos da matriz, para obter um extrato final mais limpo e diminuir o número de compostos interferentes e desta forma tentar diminuir a influência da matriz sobre os analitos. Os materiais utilizados foram: alumina neutra, Florisil e sílica. As combinações testadas entre adsorvente e co-coluna foram as seguintes: Florisil e alumina neutra como co-coluna, alumina neutra e Florisil como co-coluna e alumina neutra e sílica como co-coluna. O Florisil como adsorvente, também

apresentou valores satisfatórios de recuperação para a maioria dos analitos. Por este motivo foi realizado um experimento utilizando Florisil como adsorvente e alumina neutra como co-coluna. Foi utilizada a proporção matriz/adsorvente que apresentou os melhores valores de recuperações nos experimentos anteriores, ou seja, a proporção de 4:1, utilizando 20 mL de diclorometano como eluente. Para cada experimento foi usado 0,5 g do adsorvente testado como co-coluna. Os resultados obtidos para as recuperações são mostrados na Tabela 13.

A utilização da sílica como co-coluna não apresentou valores satisfatórios, pois os valores obtidos são mais elevados que os valores obtidos sem a co-coluna, evidenciando a persistência do efeito matriz, como demonstrados na Tabela 13.

TABELA 13 – Teste utilizando a co-coluna MSPD tendo DCM como solvente de eluição e alumina como suporte.

| Pesticidas | t _R (min) | Concentração (mg.L ⁻¹) | Recuperação (%) | | |
|--------------------|-------------------------|---------------------------------------|--|--|--|
| | | | Adsorvente: Florisil Co-coluna: alumina | Adsorvente: alumina Co-coluna: Florisil | Adsorvente: alumina Co-coluna: sílica |
| Dimetoato | 11,42 | 1,0 | 62,8 | 79,5 | 160,0 |
| Parationa metílica | 12,59 | 1,0 | 88,0 | 99,3 | 128,5 |
| Malationa | 12,92 | 1,0 | 91,6 | 110,8 | 172,4 |
| Tebuconazol | 16,31 | 1,0 | 32,0 | 94,7 | 93,4 |
| Cipermetrina | 21,77 | 1,0 | 102,6 | 73,6 | 253,8 |

Após a escolha da proporção em massa matriz:adsorvente 4:1 como a que apresentou valores de recuperação mais satisfatórios, ou seja, 119,7% para o dimetoato, 107,2% para a parationa metílica, 145,5% para a malationa, 251,9% para o tebuconazol e 118,9% para a cipermetrina (cis). Pode-se observar que a utilização da Florisil como adsorvente e alumina como co-coluna apresentou valores de recuperações satisfatórios para a maioria dos analitos, porém ocorreu uma considerável diminuição nas

recuperações do dimetoato, e tebuconazol. A malationa apresentou uma redução bastante satisfatória, de 145,5% para 91,6%, já a redução ocorrida com o tebuconazol não foi satisfatória, de 251,9% para 32,0%, tornando o processo de extração inadequado para este analito. A combinação que apresentou os valores mais satisfatórios foi à utilização da alumina como adsorvente e a Florisil como fase sólida na co-coluna. Podemos observar isto comparando os valores das recuperações obtidas sem a co-coluna e com a co-coluna, mostrados na tabela 14.

TABELA 14 – Recuperações dos analitos sem e com o clean-up.

| Pesticidas | Concentração (mg.L ⁻¹) | Recuperações (%) | |
|--------------------|---------------------------------------|--|--|
| | | Sem clean-up Adsorvente: alumina neutra | Com clean-up Adsorvente: alumina neutra Co-coluna: Florisil |
| Dimetoato | 1,0 | 119,3 | 79,5 |
| Parationa metílica | 1,0 | 107,2 | 99,3 |
| Malationa | 1,0 | 145,5 | 110,8 |
| Tebuconazol | 1,0 | 251,9 | 94,7 |
| Cipermetrina | 1,0 | 118,9 | 73,6 |

É possível observar que houve uma redução nos valores das recuperações de todos os analitos, com uma melhora significativa para a malationa e o tebuconazol, ajustando estes dois analitos para a faixa de recuperações aceitáveis para a validação do método. Em recente revisão sobre validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos, RIBANI et al (2004) considera os valores de recuperação dos analitos como um dos parâmetros para validação de uma metodologia analítica. Para análises em nível de traços, valores de recuperações entre 70 e 120% são aceitáveis para validação da metodologia analítica.

Ocorreu uma redução significativa na recuperação da cipermetrina, porém sem comprometer a sua validação. As variações observadas para a parationa metilica foram pouco significativas. De modo geral, é possível concluir que a utilização de uma extração com alumina como suporte e co-coluna com Florisil como fase sólida favorece a limpeza do extrato, melhorando sensivelmente os valores de recuperações. Um outro fator importante é que o extrato obtido utilizando alumina:Florisil fornece um cromatograma mais limpo, evidenciando uma maior eficiência na limpeza do extrato. Observar as Figuras 14 e 15.

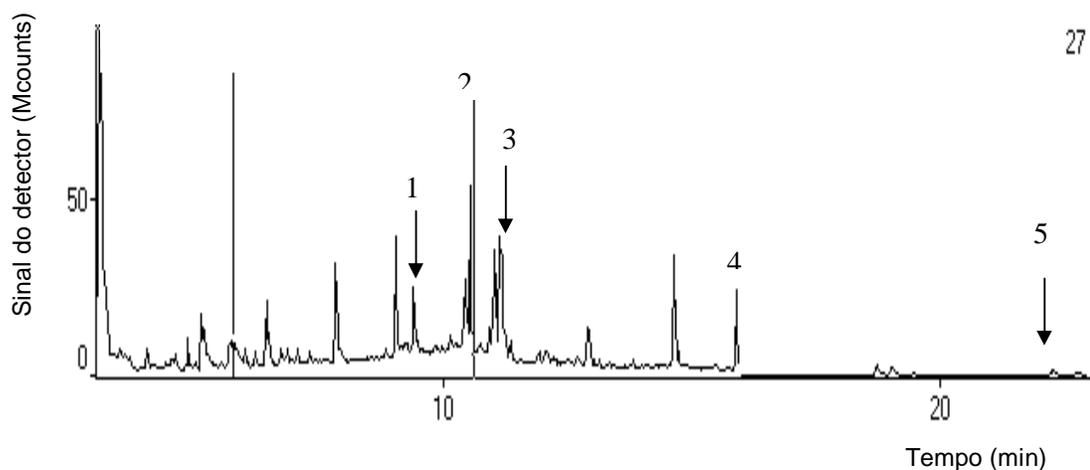


FIGURA 14- Cromatograma obtido por GC-MS (modo SIM) com extrato obtido utilizando Florisil como adsorvente e alumina neutra como co-coluna. 1 - dimetoato, 2 – parationa metilica, 3 – malationa, 4 – tebuconazol e 5 – cipermetrina. Ver condições cromatográficas no item 6.5.

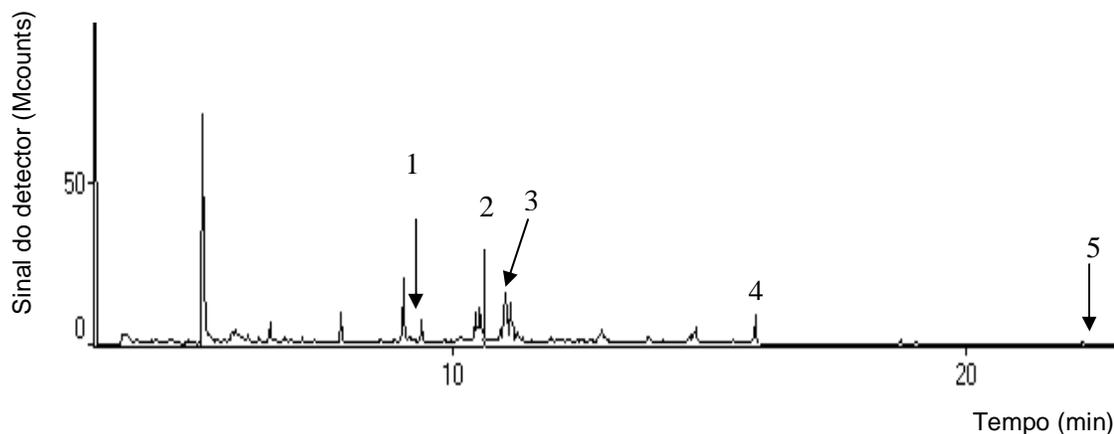


FIGURA 15 - Cromatograma obtido por GC-MS (modo SIM) com extrato obtido utilizando alumina neutra como adsorvente e Florisil como co-coluna. 1- dimetoato, 2 – parationa metílica, 3 – malationa, 4 – tebuconazol, 5 – cipermetrina. Ver condições cromatográficas no item 6.5.

7. 7 – Preparação da curva analítica.

Foram preparadas soluções padrão de cada pesticida separadamente em diclorometano com concentração de 10 mg.L^{-1} . Estas soluções foram armazenadas em um freezer para serem utilizadas como soluções intermediárias. Após identificar o efeito matriz foi realizada uma extração em uma coluna MSPD contendo a matriz dispersa no adsorvente (alumina neutra) e sem a presença dos pesticidas. A extração foi realizada utilizando o diclorometano como eluente. O extrato obtido foi armazenado para a preparação das soluções padrão para obter a curva analítica. A partir das soluções intermediárias foram preparadas soluções padrão cumulativas no extrato da matriz com concentrações 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Esta curva foi obtida no GC-MS, modelo QP5050A (UFS) com injeção manual,

com duas injeções para cada concentração, considerando uma diferença máxima na área dos analitos de 10%. Esta curva foi utilizada para o estudo de recuperação, para a seleção do eluente e do adsorvente, volume de eluição, proporção matriz/adsorvente e limpeza do extrato (utilização da co-coluna) utilizando o método da padronização externa. A Tabela 15 mostra as equações das retas e os coeficientes de correlação dos gráficos analíticos para os pesticidas estudados.

TABELA 15: Curva analítica por regressão linear para os pesticidas preparados no extrato da matriz e analisados por MSPD, GC-MS modelo QP5010 (UFS).

| Pesticida | Intervalo (mg.L ⁻¹ .) | Equação da reta* | Coefficiente de correlação(r ²) |
|--------------------|----------------------------------|------------------|---|
| Dimetoato | 0,2 – 2,0 | 538303x +101969 | 0,9928 |
| Parationa metílica | 0,2 – 2,0 | 98956x + 47396 | 0,9978 |
| Malationa | 0,2 – 2,0 | 474138x + 132453 | 0,9951 |
| Tebuconazol | 0,2 – 2,0 | 196639x + 41253 | 0,9938 |
| Cipermetrina (cis) | 0,2 – 2,0 | 32199x +25097 | 0,9966 |

* $y = bx + a$ ($y =$ área do pico; $x =$ concentração em mg.L⁻¹)

Após o estudo dos parâmetros descritos anteriormente, foi preparado um novo extrato utilizando na coluna MSPD uma co-coluna com Florisil para limpeza do extrato. Partindo-se das soluções intermediárias, foram preparadas soluções cumulativas dos cinco pesticidas no extrato obtido com concentrações de 0,01; 0,02; 0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00 e 10,00 mg.L⁻¹ que foram utilizadas para a preparação de uma nova curva analítica no GC-MS modelo QP2010 (UFBA), com injetor automático modelo AOC 20i, com duas injeções para cada concentração, considerando uma diferença máxima na área dos analitos de 10%. Para construção da curva foram considerados cinco pontos, correspondendo às concentrações de 0,10 a 1,50 mg.L⁻¹. A Tabela 16 mostra as equações de reta e os coeficientes de correlação dos gráficos analíticos obtidos para cada um dos pesticidas estudados.

TABELA 16: Curva analítica por regressão linear para os pesticidas preparados no extrato da matriz e analisados por MSPD, GC-MS modelo QP2010 (UFBA).

| Pesticida | Intervalo (mg.L ⁻¹) | Equação da reta* | Coefficiente de correlação (r ²) |
|--------------------|---------------------------------|------------------|--|
| Dimetoato | 0,10 – 1,50 | 509029x – 47483 | 0,9981 |
| Parationa metílica | 0,10 – 1,50 | 199152x - 13880 | 0,9981 |
| Malationa | 0,10 – 1,50 | 253513x – 4934 | 0,9967 |
| Tebuconazol | 0,10 – 1,50 | 194172x + 3180 | 0,9980 |
| Cipermetrina (cis) | 0,10 – 1,50 | 103467x +460 | 0,9969 |

* $y = bx + a$ ($y =$ área do pico; $x =$ concentração em mg.L⁻¹)

As Figuras 16 a 20 mostram as curvas analíticas por regressão linear de cada analito.

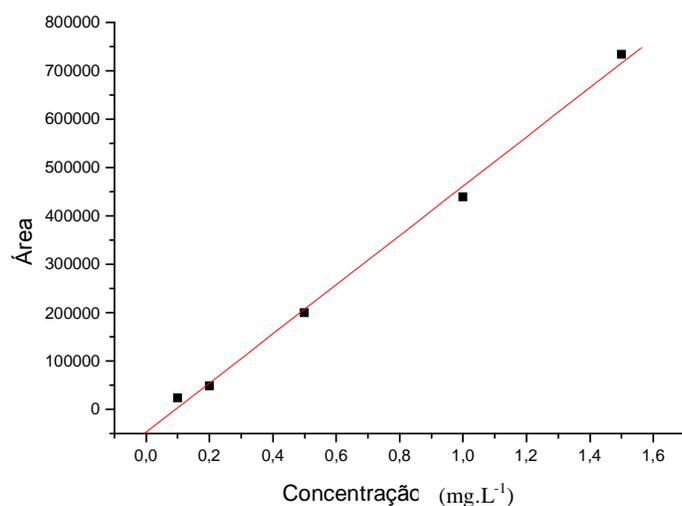


FIGURA 16: Curva analítica do dimetoato por GC-MS.

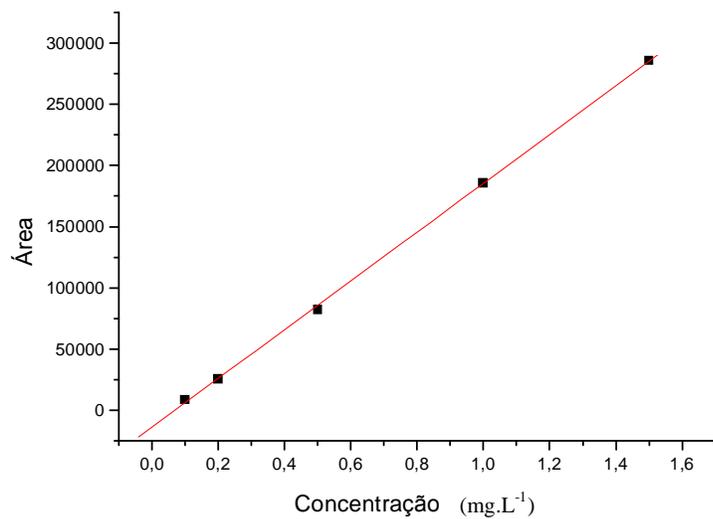


FIGURA 17: Curva analítica da parationa metílica por GC-MS.

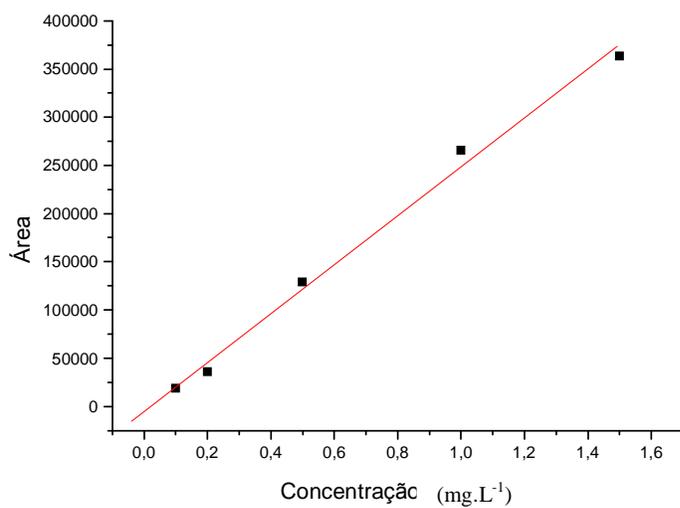


FIGURA 18: Curva analítica da malationa por GC-MS.

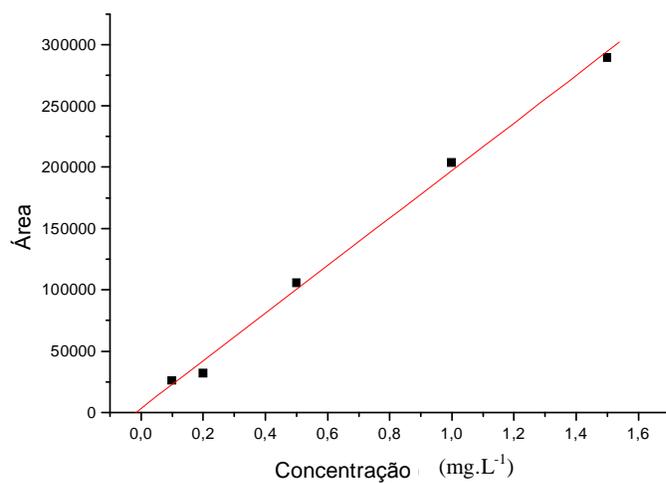


FIGURA 19: Curva analítica do tebuconazol por GC-MS.

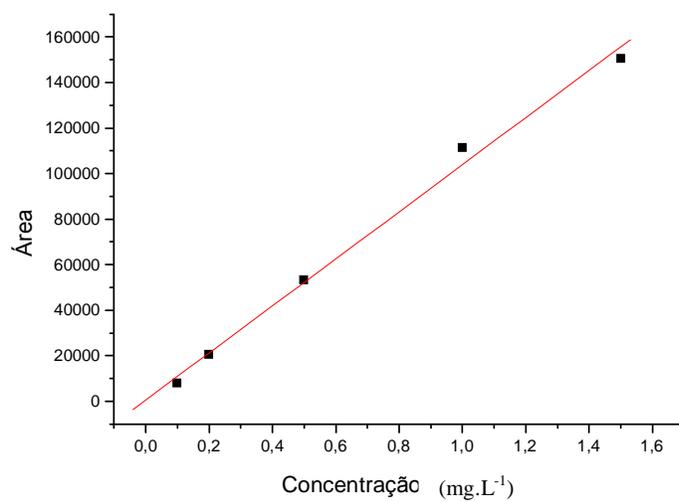


FIGURA 20: Curva analítica da cipermetrina (cis) por GC-MS.

7.8 – Estudo de recuperação e repetitividade do método

O estudo de recuperação é um dos parâmetros que deve ser avaliado na validação de uma metodologia analítica expressa por meio da exatidão e precisão. A repetitividade está associada com a concordância entre resultados de medições sucessivas do mesmo método, realizadas sob mesmas condições de medição (INMETRO, 2003). Para realizar um estudo da repetitividade do método, foi feita uma avaliação da recuperação dos pesticidas selecionados para o estudo em três níveis de fortificação mostrados na Tabela 16. Estes níveis de fortificação foram escolhidos com base nos valores do limite máximo de resíduos (LMR) de cada pesticida na matriz de tomate que são mostrados na Tabela 16. O primeiro nível de fortificação com uma concentração dos pesticidas menor que o valor do LMR, o segundo nível de fortificação com uma concentração dos pesticidas igual ao valor do LMR e o terceiro nível de fortificação com uma concentração dos pesticidas maior que o valor do LMR.

Para cada nível de fortificação foram realizadas sete replicatas. Cada extrato obtido foi analisado em replicata (duas vezes) e o valor médio de cada análise foi utilizado para o cálculo da recuperação. Os valores médios de recuperação para cada nível de fortificação são mostrados na Tabela 17.

Para validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos, os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (RIBANI et al, 2004). Estes valores são concordantes com os valores descritos na literatura por Hajslová et al (1998) para metodologias aplicadas na análise de resíduos de pesticidas.

TABELA 17: Resultados de recuperação ($n = 7$) com intervalo de confiança e estimativa de desvio padrão relativo (*relative standard deviation* – RSD), em 3 níveis de fortificação, dos pesticidas estudados em amostras de tomate por extração com dispersão da matriz em fase sólida.

| Pesticidas | LMR | Fortificação | Recuperação | RSD** |
|--------------------|------------------------|--------------|------------------------|------------|
| | (mg.kg ⁻¹) | | (mg.kg ⁻¹) | Média* (%) |
| Dimetoato | 1,00 | 0,50 | 78,8±10,9 | 11,7 |
| | | 1,00 | 78,7±12,0 | 12,9 |
| | | 2,00 | 82,3±6,2 | 6,5 |
| Parationa metílica | 0,50 | 0,20 | 79,3±3,4 | 3,7 |
| | | 0,50 | 88,0±11,5 | 11,0 |
| | | 1,00 | 95,3±12,4 | 11,0 |
| Malationa | 3,00 | 0,50 | 99,7±6,6 | 5,6 |
| | | 3,00 | 99,1±10,5 | 9,0 |
| | | 4,00 | 100,1±18,5 | 15,5 |
| Tebuconazol | 0,10 | 0,05 | 81,0±8,6 | 9,0 |
| | | 0,10 | 92,6±8,5 | 7,7 |
| | | 0,50 | 80,7±8,1 | 8,5 |
| Cipermetrina (cis) | 0,10 | 0,05 | 77,3±9,2 | 11,9 |
| | | 0,10 | 84,1±10,5 | 10,6 |
| | | 0,50 | 89,9±9,2 | 8,6 |

FONTE : LMR – ANVISA (2005). O valor do LMR da parationa metílica foi obtido em FAO/OMS (1994).

*Intervalo de confiança: $x \pm t.s/n^{-1/2}$ (99%)

**Estimativa do desvio padrão relativo, RSD (%) = $s. 100 / x$

As recuperações dos pesticidas em amostras de tomate fortificadas, com adição de padrões no intervalo de 0,05 mg/kg a 4,0 mg/kg, variaram de 77,3% a 100,1%, com uma média de 87,1%. A estimativa do desvio padrão relativo (RSD) variou na faixa de 3,7% a 15,5%.

O dimetoato apresentou valores médios de recuperação de 78,7% a 82,3%, apresentando melhor recuperação com a fortificação de 2,0 mg/kg. A parationa metílica apresentou recuperações médias de 79,3% a 95,3%, com melhores valores de recuperação para o nível de concentração de 1,0

mg/kg. A parationa metílica apresentou menor variação nos valores de recuperação na fortificação de 0,2 mg/kg. A malationa apresentou os melhores valores de recuperação com resultados próximos nos três níveis de fortificação, os valores variaram de 99,1% a 100,1%. A fortificação da malationa de 0,50 mg/kg apresentou o menor desvio padrão relativo.

Para o tebuconazol as recuperações médias variaram de 81,0% a 92,6%, a melhor recuperação foi obtida com a fortificação de 0,10 mg/kg. O tebuconazol apresentou um menor desvio padrão relativo de 7,7% para o nível de concentração de 0,10 mg/kg. A cipermetrina (cis) apresentou valores de recuperação de 77,3% a 89,9%. Os melhores valores de recuperação foram obtidos para o nível de concentração de 0,50 mg/kg. No nível de concentração de 0,05 mg/kg para cipermetrina (cis), o método apresentou menor recuperação deste composto, conseguindo uma recuperação média de 77,3% e apresentando uma estimativa de desvio padrão relativo de 11,9%. O método proposto mostrou-se mais eficiente na recuperação dos pesticidas nos níveis de concentração mais elevado, com exceção do tebuconazol que apresentou melhores valores de recuperação no nível intermediário. Os menores valores da estimativa de desvio padrão relativo para os pesticidas dimetoato e cipermetrina-cis foram obtidos no nível mais elevado de fortificação, para a parationa metílica e a malationa os melhores valores foram obtidos no menor nível de fortificação e para o tebuconazol no nível intermediário.

Considerando os valores de limites máximos de resíduos (LMR) da ANVISA (2005) permitidos para o tomate, que variam de 0,10 mg/kg (Tebuconazol e cipermetrina-cis) a 3,0 mg/kg (Malationa), os valores de recuperação média e a estimativa de desvio padrão relativo dos pesticidas nos três níveis de fortificação foram: dimetoato (79,9%; RSD= 10,3%), parationa metílica (87,5%; RSD= 8,5%), malationa (99,6%; RSD = 10,0%), tebuconazol (84,7%; RSD = 8,4%) e cipermetrina-cis (83,7%; RSD = 10,3). Este grupo de pesticidas pode ser analisado pela metodologia proposta utilizando a extração por dispersão da matriz em fase sólida.

As Figuras 21, 22 e 23 apresentam os cromatogramas dos extratos obtidos por MSPD em três níveis de fortificação e analisados por GC/MS.

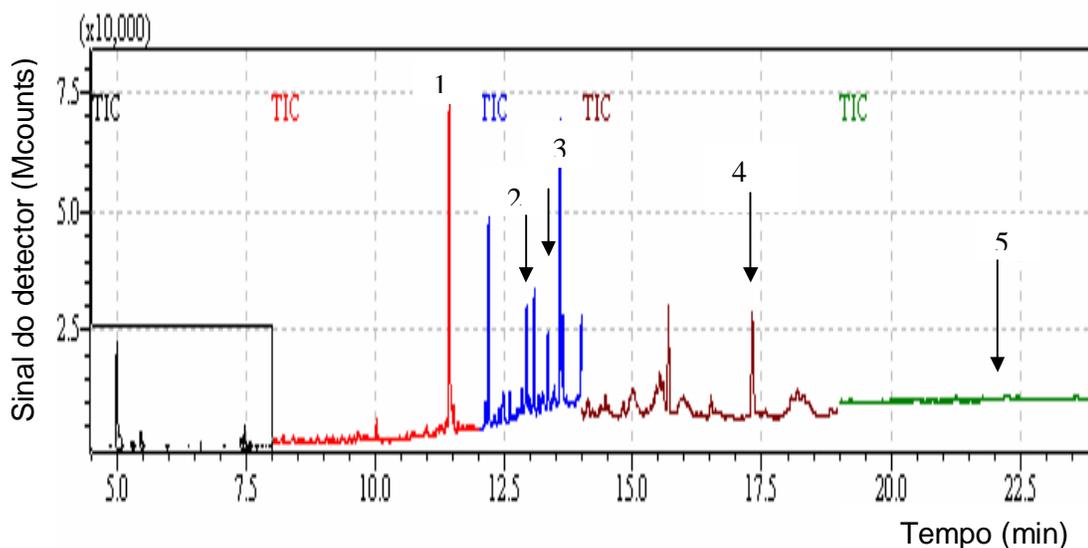


FIGURA 21: Cromatograma obtido por GC/MS da amostra de tomate fortificada por MSPD com os pesticidas: 1. dimetoato (250 ng.g^{-1}); 2. parationa metílica (100 ng.g^{-1}); 3. malationa (250 ng.g^{-1}); 4. Tebuconazol (50 ng.g^{-1}) e 5. Cipermetrina-cis (50 ng.g^{-1}). Ver condições cromatográficas no item 6.5.

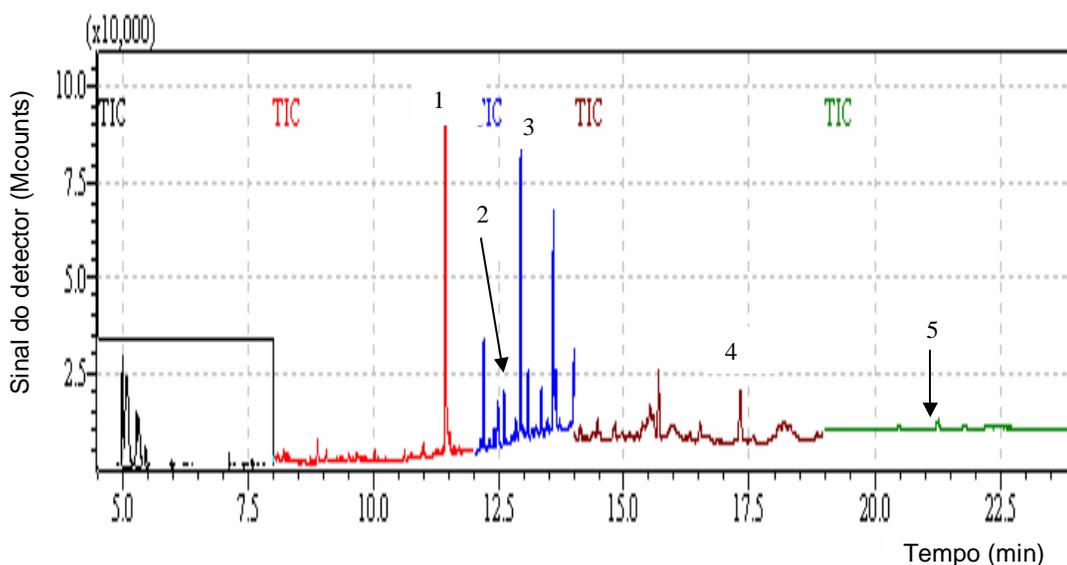


FIGURA 22: Cromatograma obtido por GC/MS da amostra de tomate fortificada por MSPD com os pesticidas : 1. dimetoato ($1,0 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$); 2. parationa metílica ($0,5 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$); 3. malationa ($3,0 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$); 4. Tebuconazol ($0,1 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$) e 5. Cipermetrina-cis ($0,1 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$). Ver condições cromatográficas no item 6.5.

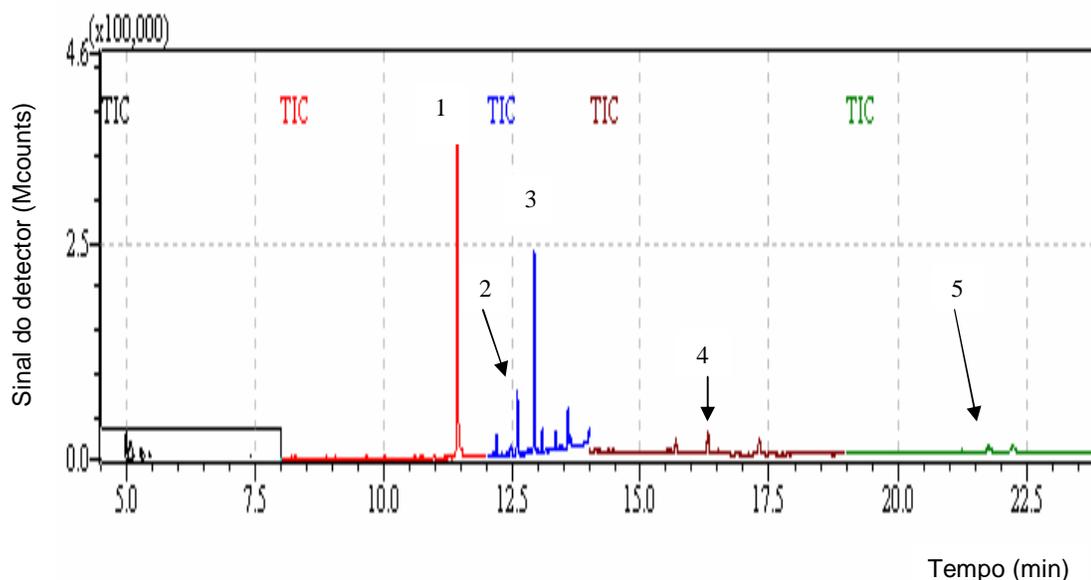


FIGURA 23: Cromatograma obtido por GC/MS da amostra de tomate fortificadas por MSPD com os pesticidas: 1. dimetoato ($2,0 \mu\text{g.g}^{-1}$); 2. parationa metílica ($1,0 \mu\text{g.g}^{-1}$); 3. malationa ($4,0 \mu\text{g.g}^{-1}$); 4. Tebuconazol ($0,5 \mu\text{g.g}^{-1}$) e 5. Cipermetrina-cis ($0,5 \mu\text{g.g}^{-1}$). Ver condições cromatográficas no item 6.5.

7.9 – Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do método.

O limite de detecção (LOD – *Limit of Detection*) do método representa a menor concentração da substância em estudo que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI et al, 2004). O limite de detecção de um analito no método é a menor concentração ou massa que um analito pode ser detectado com 99% de confiança de que é maior que o branco (HARRIS, 1999).

O limite de quantificação (LOQ – *Limit of Quantitation*) representa a menor concentração ou massa da substância em exame que pode ser

medida, utilizando um determinado procedimento experimental (INMETRO, 2003).

Os limites de detecção e quantificação foram calculados através do desvio padrão ($n = 7$) das concentrações encontradas no menor nível de fortificação de cada analito e do branco da amostra, subtraindo o branco de cada medida realizada com o analito. O limite de detecção para cada analito foi calculado através da relação mostrada abaixo (INMETRO, 2003).

$$LOD = t_{99\%} \cdot s$$

onde o valor de t (Student) é para 99% de confiança, e s o desvio padrão das medidas em replicata ($n = 7$). Entretanto foi utilizado o valor de 98% que é o t unilateral ($t = 3,143$). O limite de quantificação é estabelecido como dez vezes a estimativa do desvio padrão (INMETRO, 2003). Os limites de quantificação de cada analito foram calculados através da relação.

$$LOQ = 10 \cdot s$$

A Tabela 18 mostra os valores dos limites de detecção e de quantificação de cada analito.

TABELA 18: Limites de detecção e limites de quantificação dos pesticidas em estudo na metodologia analítica desenvolvida.

| Pesticida | LMR (mg.kg ⁻¹) | LOD (mg.kg ⁻¹) | LOQ (mg.kg ⁻¹) |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Dimetoato | 1,00 | 0,014 | 0,046 |
| Parationa metílica | 0,50 | 0,020 | 0,060 |
| Malationa | 3,00 | 0,010 | 0,031 |
| Tebuconazol | 0,10 | 0,018 | 0,056 |
| Cipermetrina (cis) | 0,10 | 0,020 | 0,060 |

Os valores dos limites de quantificação de todos os pesticidas estudados foram menores que os valores do limite máximo de resíduos,

mostrando que a metodologia desenvolvida pode ser aplicada para a análise deste grupo de pesticidas na matriz de tomate. Os valores dos limites de quantificação variaram de 0,031 a 0,060 mg.kg⁻¹. A malationa apresentou uma maior relação entre o LOQ e o LMR, ou seja, o seu LOQ é 96 vezes menor que o seu LMR em tomate e a cipermetrina (cis) a menor relação, ou seja, o seu LOQ é 1,66 vezes menor que o seu LMR em tomate. A Figura 24 mostra o cromatograma do branco da amostra, correspondente ao extrato obtido em uma coluna MSPD sem a presença dos analitos.

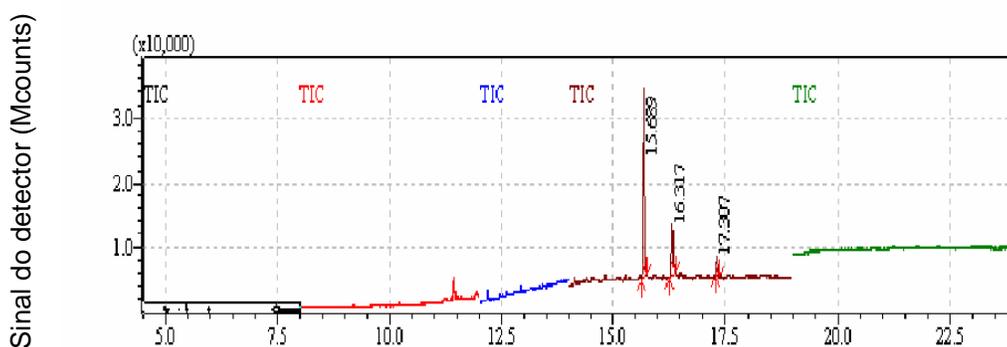


FIGURA 24: Cromatograma do branco da amostra de tomate obtido por GC-MS (modo SIM). Para condições cromatográficas descritas no item 6.5.

7.10 – Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI et al, 2004). A faixa linear de trabalho de cada analito foi determinada a partir de um conjunto de medições experimentais, usando o método matemático da regressão linear utilizando a partir de pontos experimentais, o coeficiente de correlação r . A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a

0,99 como uma evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. Os valores dos intervalos das faixas lineares de trabalho de cada pesticida são mostrados na Tabela 19.

TABELA 19: Intervalos da faixa de trabalho de cada pesticida.

| pesticida | Intervalo (mg.L ⁻¹) |
|--------------------|---------------------------------|
| Dimetoato | 0,05 – 2,00 |
| Parationa metílica | 0,05 – 10,00 |
| Malationa | 0,01 – 10,00 |
| Tebuconazol | 0,05 – 10,00 |
| Cipermetrina (cis) | 0,05 – 10,00 |

Para o estudo da linearidade, foram estudadas soluções padrão dos pesticidas preparados no extrato da matriz em dez níveis de concentração (0,01; 0,02; 0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00 e 10,00 mg.L⁻¹). O dimetoato apresentou uma faixa de linear de 0,05 a 2,00 mg.L⁻¹, correspondendo a menor faixa linear entre os compostos estudados. A malationa apresentou a maior faixa de trabalho, que variou de 0,01 a 10,0 mg.L⁻¹. Os demais compostos apresentaram uma faixa linear de trabalho variando de 0,05 a 10,00 mg.L⁻¹. A Figura 25 mostra a faixa linear de trabalho da malationa, como exemplo.

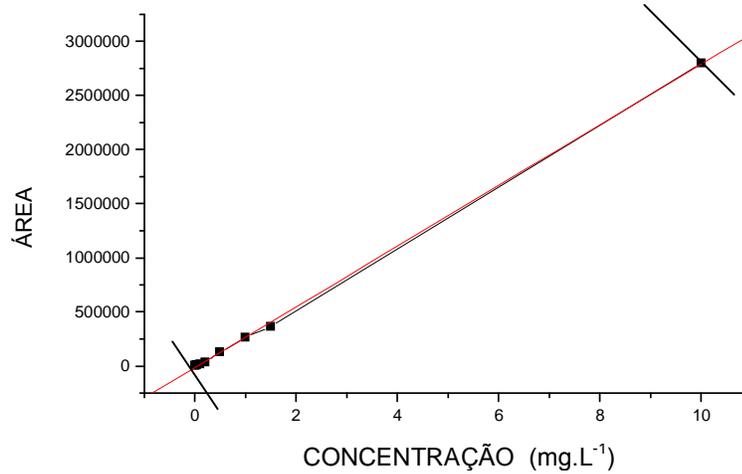


FIGURA 25: Faixa linear de trabalho da malationa obtido por GC-MS.

7.11 – Aplicação da metodologia desenvolvida: análise de amostras comerciais de tomate

Foram adquiridas amostras de tomate em diferentes pontos na cidade de Aracaju. Para cada amostra foram feitas três extrações utilizando a metodologia desenvolvida. As concentrações dos pesticidas foram calculadas utilizando a seguinte relação de concentração:

$$\text{Resultado (mg.kg}^{-1}\text{)} = \frac{C_{\text{curva}} \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} \cdot V_{\text{final}} \text{ (mL)}}{\text{Massa}_{\text{amostra}} \text{ (g)}}$$

A Tabela 20 mostra os resultados encontrados nas análises das amostras comerciais de tomate.

TABELA 20: Resultado das amostras comerciais de tomate (n = 3).

| Pesticida | LMR (mg.kg ⁻¹) | Concentração média (mg.kg ⁻¹) | | | |
|--------------------|-------------------------------|---|-----------|-----------|-----------|
| | | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 | Amostra 4 |
| Dimetoato | 1,00 | 0,095 | 0,115 | 0,075 | 0,096 |
| Parationa metílica | 0,50 | n.d | n.d | 0,120 | 0,097 |
| Malationa | 3,00 | 0,075 | 0,094 | 0,088 | 0,096 |
| Tebuconazol | 0,10 | n.d | n.d | n.d | n.d |
| Cipermetrina(cis) | 0,10 | n.d | n.d | n.d | n.d |

n.d – não detectado

Em todas as amostras analisadas, foram encontrados e quantificados resíduos de dimetoato e malationa. Também foram quantificados resíduos de parationa metílica em duas das quatro amostras analisadas. Não foram detectados resíduos de tebuconazol e cipermetrina (cis) nas quatro amostras analisadas. Fazendo uma comparação entre os valores máximos de resíduos que é permitido para cada pesticida com os valores encontrados, é possível observar que as concentrações médias encontradas são dez vezes menor para o dimetoato, cinco vezes menor para a parationa metílica e aproximadamente trinta vezes menor para a malationa.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia analítica proposta utilizando a técnica de extração por dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) mostrou-se eficiente para extrair os pesticidas dimetoato, parationa metílica, malationa, tebuconazol e cipermetrina (cis) em tomate. Para validação do método, foram determinados a linearidade, precisão, limites de detecção e de quantificação do método, além de estudos de recuperação.

Os valores das recuperações médias variaram de $77,3\% \pm 9,2\%$ a $100,1\% \pm 18,5\%$, com limites de quantificação entre $0,031$ e $0,060 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Comparativamente, a técnica de extração por dispersão da matriz em fase sólida permitiu a utilização de pequenas quantidades de amostra, o que exigiu reduzida quantidade de adsorventes e volumes de solvente orgânico, diminuindo os custos da análise. Outra vantagem desta técnica é a quantidade de etapas envolvidas, evitando manipulações mais complexas da amostra e reduzindo o tempo total de análise.

Por fim, o método desenvolvido foi aplicado em amostras comerciais de tomate, as quais apresentaram resíduos dos pesticidas dimetoato, parationa metílica e malationa. Os níveis de concentração encontrados nas amostras analisadas estavam abaixo dos limites estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Realizar novos estudos com a metodologia desenvolvida por dispersão da matriz em fase sólida em matriz de tomate, acrescentando novos princípios ativos.

Aplicação da metodologia desenvolvida em um programa de monitoramento para avaliar os níveis de concentração dos pesticidas estudados em tomates comercializados na cidade de Aracaju e em cidades do interior do estado, verificando as tendências de consumo.

Realização de um estudo em uma propriedade produtora de tomate, visando o monitoramento dos níveis de concentração dos pesticidas em tomate, desde a aplicação dos mesmos até a comercialização do fruto, avaliando a variação das concentrações em função do tempo.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Sistema de Informações sobre Agrotóxicos**. Disponível em:

http://www4.anisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_pesquisa_ingrediente.asp;

[acesso em 10/05/2004].

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

ARAÚJO, A. C. P.; NOGUEIRA, D. P.; AUGUSTO, L. G. S. Impacto dos praguicidas na saúde: estudo da cultura de tomate. **Revista de Saúde Pública**. V.34, nº 3; p. 35 –39 (2000).

ARAÚJO, A.C.P.; TELLES, D. L.; GORNI, R.; LIMA, L.L.A. Endosulfan residues in Brazilian tomatoes and their impact on public health and the environment. **Environmental Contamination and Toxicology**. V.62, p.671-676 (1999).

AZEVEDO, L. A. S. **Danos ocasionados por fungos e as estratégias de controle**, Disponível em: <http://www.uff.br/cienciaambiental/mv/mv1/MV1> [acesso em 03/01/2005]

BARKER, S. A. Matrix solid-phase dispersion. **LC-GC** (supplement), p. S37-S40, 1998.

BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 4ª ed. São Paulo, Ed. Roca, 1984.

BARRETTO, H. H.C. et al. Monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos comercializados no estado de São Paulo em 1994. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.6,jan-dez, p. 57 –63 (1996).

BASTOS, A. E. R. **Agricultura e meio ambiente**. São Paulo: Scipione, 1997.

BERNAL, J. L.; NOZAL, M^a. J. del; JIMÉNEZ, J. J.; RIVERA, J. M^a. Matrix effects in the determination of acaricides and fungicides in must by gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection. **Journal of chromatography A**,v. 778, p. 111-117 (1997).

BOWERS, W.S. et al., ed. **Chemistry of plant protection**. Berlin, Springer-Verlag, 1990. 312p.

CARVALHO, G. A et al. Efeitos de alguns inseticidas utilizados na cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill). **Ciências agrotécnicas**, v.26, n.6, no-dez. Lavras, 2002. Disponível em <http://www.editora.ufla.br/revista/26.6/art06.pdf> [acesso em 30/12/2004]

DÓREA, H. S. **Análise multirresíduo de pesticidas organofosforados e piretróides em frutas por CGC, após extração com fluido supercrítico. Comparando com LLE, SPE e MSPD.** São Paulo, 1999. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

DÓREA, H. S. & LOPES, W. G. Aplicação da técnica de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) na análise de pesticidas em quiabo por CG-EM. **Química Nova**, v. 27, nº 6, p. 892-892 (2004).

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.embrapa.br/> [acesso em 10/05/2004].

ETO, M. **Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry**, Cleveland, Ohio, CRC, 1977. 387 p.

FAO/OMS, **Codex alimentarius**. 2 ed. Roma, FAO, vol. 2, 1994. 495 p.

FELLENBERG, G. Introdução aos problemas de poluição ambiental. São Paulo, E.P.U., 1980.

FERREIRA, V.; ESCUDERA, A; SALAFRANCA, J.; FERNÁNDEZ, P.; CACHO, J. Matrix effects and solute discrimination when injecting dirty samples in capillary columns comparative study between classical split and splitless injections. **Journal of Chromatography A**. v.655, p.257-266 (1993).

GOBO, A B.; KUZ, M. H. S.; PIZZUTTI, I. R.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Development and validation of methodology for the determination of residues of organophosphorus pesticides in tomatoes. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.15. Nº 6, p.945-950, (2004).

GAMBACORTA, G.; FACCIA, M.; LAMACCHIA, C.; DI LUCCIA,; LA NOTTE, E. Pesticide residues in tomato grown in open field. **Food Control**, Article in press, 2004.

GRISOLIA, C. K. As interações químicas entre misturas de pesticidas e seus potenciais de mutagenicidade **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.6, p.31-42, Jan./Dez. 1996.

GROB, R.L.; BARRY, E.F. Modern Practice of Gas Chromatography, 4a. ed., Wiley Interscience, 2004.

Hajslová, J.; Holadová, K.; Kocourek, V.; Poustka, J.; Godula, M.; Cuhra, P.; Kempny, M. Matrix-induced effects: a critical point in the

gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v.800,p. 283 – 295 (1998).

HARRIS, D. C.; Análise Química Quantitativa, 5ª. Ed., LTC, 1999, 862p., apud GRANT, C. L.; HEWITT, A. D.; JENKINS, T.F. Am. Lab., 1991, p.15.

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, **DOG-CGCRE-008**, 2003.

KASCHERES, C.; CUNHA, I.B.S. Piretróides. **Química nova**, v. 12, n.3, p.272-281, 1989.

KRISTENSON, E. M.; HAVERKATE, E. G. J.; SLOOTEN, C. J.; RAMOS, L. Miniaturized automated matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides in fruit followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. **Journal of chromatography A**, v. 917,p. 277-286 (2001).

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (Solid phase extraction)** – São Carlos: Ed. Rima, 2004.

LOPES, W. G.; DÓREA, H. S. Determinação de pesticidas em feijão por Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD) **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 73-82, Jan./Dez. 2003.

MICHEL, M.; BUSZEWSKI, B. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the determination analysis of carbendazim residue in plant material. **Journal of chromatography B**, v.800,p.309 – 314 (2004).

MORAES, S. **Contribuição para o estudo das intoxicações por carbamatos: o caso do chumbinho no Rio de Janeiro**. Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública; 1999. Disponível em: [acesso em 04/01/2005].

MORAES, S. L.. et al. Análise de resíduos de pesticidas em tomates por cromatografia em camada delgada. **Química Nova**, v. 25 n. 2,p. 112 –117 (2002).

NAKANO, V. E. **Segurança em controle químico de vetores**. Secretaria da Saúde. São Paulo. SUCEN. Superintendência de controle de endemias. 1999. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/saudetrabalhador/textosegurancae controle quimico.htm> [acesso em 12/10/2003].

NAVARRO, M.; PICÓ, Y.; MARÍN, R.; MAÑES, J. Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of a new generation of fungicides in fruits and vegetables. **Journal of chromatography A**, v.968,p. 201 – 209 (2002).

PICANÇO, M. C. et al. **Manejo de resistência a inseticidas na cultura do tomate: Suscetibilidade de populações da traça do tomateiro a inseticidas**. UFV, 2004.

PINHEIRO, A S. **Utilização de agrotóxicos no perímetro irrigado Califórnia e suas influências na saúde do trabalhador rural**. São Cristóvão, 2004. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento, PRODEMA) , Universidade Federal de Sergipe.

RASTRELLI, R.; TOTARO, K.; DE SIMONE, F. Determination of organophosphorus pesticide residues in Cilento (Campania, Italy) virgin olive oil by capillary gas chromatography, **Food Chemistry**, v.79,p. 303 – 305 (2002).

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, nº. 5, 771-780, 2004.

ROBERTS, T. R. & HUDSON, D. H. **Metabolic Pathways of Agrochemicals**. Cambridge. The Royal Society of Chemistry, 1999, vol. 2.

SANNINO, A.; BOLZONI, L.; BANDINI, M. Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v.1036,p.161 – 169 (2004).

SINDAG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/new/setor/index.php> [acesso em: 04/01/2005].

SKOOG, HOLLER & NIEMAN; Tradução CAACELLI, I. **Princípios de análise instrumental**. 5ª ed. Porto Alegre; Ed. Bookman, 2002.

SOBRINHO, L. L.; DÓREA, H.S. Analysis of pesticide residues in rice using matrix solid-phase dispersion (MSPD). **Journal of The Brazilian Chemistry Society**, v.15, Nº 5, 690-694, 2004.

SPADOTTO, C. A; GOMES, M. A. F; RODRIGUES, G. S. Uso de agrotóxicos nas diferentes regiões brasileiras: Subsídio para a geomedicina. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.8, jan./Dez. 1998.

SPADOTTO, C. A; FILIZOLA, H.; GOMES, M. A F. Avaliação do potencial de lixiviação de pesticidas em latossolo da região de Guairá, SP. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 11, jan./Dez. 2001.

STEPÁN, R.; HASJSLOVÁ, J.; KOCOUREK, V.; TICHÁ, J. Uncertainties of gas chromatography measurement of troublesome pesticide residues in

apples employing conventional and mass spectrometric detectors. **Analytica Chimica Acta**, v.520,p.245 – 255 (2004).

ZAMBRONE, F. A. D; ALVES, A.; NAIDIN, L.C.; KUCINSKI, B.; LARA, W.H. Defensivos agrícolas ou agrotóxicos? , **Ciência Hoje**, v.4, n.22, 1986, p. 42-64.

ZROSTLÍKOVÁ, J.; HASJSLOVÁ, J.; POUSTKA, F.; BEGANY, P. Alternative calibration approaches to compensate the effects of co-extracted matrix components in liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in plant materials. **Journal of Chromatography A**, v.973,p.13 – 26 (2002).

ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M. Analysis of pesticide residues in Brazilian medicinal plants: Matrix solid-phase dispersion versus conventional (European Pharmacopoeia) methods. **Journal of The Brazilian Chemistry Society**. Vol. 14, Nº .2,p.304 – 309 (2003).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)