

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
ORGÂNICA**

TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO DOS PARÂMETROS DE OTIMIZAÇÃO E
APLICAÇÃO
DA MICRO-EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA
DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS
EM ALFACE (*Lactuca sativa L.*) E ÁGUA**

Leila Martins da Costa Quinteiro

2004



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA**

**ESTUDO DOS PARÂMETROS DE OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO
DA MICRO-EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA
DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS
EM ALFACE (*Lactuca sativa L.*) E ÁGUA**

LEILA MARTINS DA COSTA QUINTEIRO

Sob a Orientação do Professor
Dr Aurélio Baird Buarque Ferreira

Sob a Co-orientação do Professor
Dr Ronoel Luiz De Oliveira Godoy

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências e área de
concentração em Química Orgânica.

Seropédica, RJ

Outubro, 2004

632.95042

Q7e

T

Quinteiro, Leila Martins da Costa, 1958-
Estudo dos parâmetros de otimização e aplicação da
micro-extração em fase sólida para determinação de
agrotóxicos organoclorados em alface (*Lactuca sativa* L.)
e água/ Leila Martins da Costa Quinteiro. – 2004.
167f. : graf., tab.

Orientador: Aurélio Baird Buarque Ferreira.
Tese(doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, Instituto de Ciências Exatas.
Inclui bibliografia.

1. Pesticidas clorados – Análise – Teses. 2. Pesticidas –
Resíduos em alimentos – Teses. 3. Alface – Cultivo –
Teses. 4. Água – Teor dos pesticidas – Teses. I. Ferreira,
Aurélio Baird Buarque . II. Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Exatas.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

Autor

LEILA MARTINS DA COSTA QUINTEIRO

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica, área de concentração em Química Orgânica, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

TESE APROVADA EM 29/10/2004.



Dr Aurélio Baird Buarque Ferreira – DEQUIM / UFRRJ



Dr Ronoel Luiz de Oliveira Godoy – CTAA / EMBRAPA



Dra Cristina Maria Barra – DEQUIM / UFRRJ

Dra Izabela Miranda de Castro – CTAA / EMBRAPA



Dr Carlos Alberto B. De Maria – Instituto Biomédico / UNIRIO



Dra Rosane Nora Castro – DEQUIM / UFRRJ (suplente)



Dra Katia G. de Lima Araújo – Faculdade de Farmácia / UFF (suplente)

*"A Deus, ao meu querido marido
Agmar, às minhas filhas,
Mariana e Juliana, e aos meus
queridos pais, dedico"*

"Tudo me toca, me assombra ou me comove: o mais cotidiano e o mais inusitado. Tudo forma o cenário e o caminho. Que a maturidade me fez amar com menos frivolidade e não menos alegria"

LYA LUFT

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus e a Nossa Senhora, nossa mãe celeste e rainha da Paz.

Aos meus pais, Salvador e Leda que sempre foram meus grandes amigos e incentivadores, co-responsáveis de minhas conquistas.

Ao orientador Aurélio, pelo incentivo e por se mostrar disponível nos momentos de precisão.

Ao co-orientador Ronoel, por ter me aceitado de braços abertos como orientada, por sua grande amizade, confiança, incentivo, companheirismo e por seus conselhos e momentos de muitos risos.

À UFRRJ pela oportunidade oferecida e ao Professor Porfírio, que mais do que chefe do Departamento de Química foi um amigo que, de perto, me acompanhou, apoiando-me, em todo processo burocrático.

À EMBRAPA - CTAA pelas condições oferecidas para o desenvolvimento da pesquisa e meu aprimoramento, esperando que esta tese venha a contribuir com o desenvolvimento de uma nova linha de trabalho.

À Professora e amiga Cristina Maria Barra pela grande ajuda nas etapas finais dessa tese, tão estressantes.

Ao corpo docente da pós-graduação do Programa de Pós-graduação em Química Orgânica da UFRRJ, professores Anselmo, Áurea, Aurélio, Carlos Maurício, João, José Carlos, Marco Edilson, Mário, Rosane e Victor, por seus ensinamentos e dedicação.

Aos meus amigos Professores do Setor de Química Analítica e Geral da UFRRJ Antônia, David, Evelton, Maurício, Otávio e aos demais setores, pelo apoio e incentivo, sempre torcendo por mim e prontos a me ajudar.

Ao funcionário Gilberto do Departamento de Imprensa UFRRJ, que com muita boa vontade fez os desenhos deste trabalho.

À pesquisadora da EMBRAPA - CTAA, Izabela Miranda de Castro, pelas sugestões, e incentivo nos momentos de desânimo.

À funcionária da EMBRAPA - CTAA Marianna pela amizade e valioso apoio técnico, pena que foi no finalzinho.

Aos pesquisadores e funcionários da EMBRAPA-CTAA, como Lourdinha, Jeane, Regininha, Graça, João, Antônio, dentre outros, pela amizade.

Ao Professor Romeu Vianni (*in memoria*), sábio amigo e meu orientador do mestrado, pelo muito que me ensinou.

Às amigas Elizete Amorim e a Fátima Zeli pela amizade e disponibilidade para o que fosse preciso.

Agradeço em especial a grande amiga Ana Lúcia por sua amizade, pelo seu apoio, valiosas sugestões, encorajamento e ajuda na confecção deste trabalho.

Agradeço em especial ao Ricardo, Rogério, Lílian e Salvador, meus queridos irmãos, que sempre me deram forças, apoiando as conquistas de minha vida. E aos meus sobrinhos, Rafaela, Luisa, Gabriel e também ao Daniel, que tornam a minha vida mais alegre e colorida.

Por fim, com importância sem preço, agradeço o grande carinho, o encorajamento e a compreensão de meu marido e de minhas filhas sempre me ajudando de algum modo, tornando a realização deste trabalho mais tranqüila.

RESUMO

A prática predatória da produção agrícola tem levado ao acúmulo de defensivos agrícolas no meio ambiente, contaminando o solo, os espelhos d'água e até as áreas virgens, ou seja, aquelas que nunca receberam aplicação de pesticidas. Embora os agrotóxicos mais carcinogênicos, considerados poluentes de grande persistência, já tenham sido proibidos no Brasil (DDT, BHC, etc), existem ainda outros, menos persistentes, que podem se degradar originando outros tão ou mais tóxicos. Atualmente, a qualidade de todos os alimentos está intrinsecamente ligada, não só à composição nutricional e ao estado de conservação, mas também aos níveis residuais de elementos tóxicos ao homem. É importante procurar desenvolver e aplicar a filosofia das boas técnicas agrônômicas; educação ambiental; educação do consumidor; legislação com repressão pesada sobre os infratores; análises fiscais rotineiras por órgãos oficiais competentes, para controle dos teores dos limites residuais máximos (LMR) em alimentos e em águas de consumo humano. Com este fim foi desenvolvida uma metodologia simples, eficiente e econômica baseada na utilização de micro-extração em fase sólida (MFES) para determinação dos agrotóxicos (Lindane®, Aldrin®, DDE, Dieldrin®, TDE and Mirex®) em amostras de água e alface por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (CG-DCE). Este método pode ser aplicado em pequenos volumes de amostra (em torno de 1,0 mL) e na necessita de uso de solventes e na análise de multi-resíduo não há necessidade de modificar a força iônica ou o pH da matriz. Das amostras analisadas, após *screening*, foi encontrado o agrotóxico organoclorado DDE somente nas amostras de alface, na faixa entre 29- 262 ng/g, com % CV médio de 13 %. A exatidão da quantificação de DDE nas amostras de alface foi testada pela % de recuperação e comparação com um método oficial para determinação de agrotóxicos, obtendo-se uma recuperação entre 93- 96 % com %CV médio de 14 %. Pela extração ELL (oficial) foi encontrado um valor de para o DDE nas quatro amostras de alface na faixa de 25 – 240 ng/g, com %CV médio de 14 %, e recuperação entre 92 – 98 %, com CV médio de 12 %. Os dois métodos não diferem estatisticamente entre si, a um nível da confiança de 95 %. A presença de DDE como contaminante pode estar relacionada com a aplicação de DDT em vez do próprio DDE, pois o DDT foi utilizado mundialmente em larga escala até 1985, quando o seu uso foi proibido no Brasil. O resultado obtido para as amostras de alface é indicativo de persistência ambiental de agrotóxicos organoclorados.

ABSTRACT

Predatory practice of agricultural production has led to the accumulation of agricultural pesticides in the environment, contaminating the ground, water resources and even virgin areas, those that never received application agrochemicals. Although many of the carcinogenic, toxic agrochemicals, considered as highly persistent pollutants have already been forbidden in Brazil (DDT, BHC, etc), there are others, less persistent, that can be degraded into others, as toxic, or even more toxic. Currently, the quality of all the foodstuffs is defined not only by its nutritional composition and state of conservation, but also by the levels of residual substances, toxic to man. It is important to develop and apply the philosophy of the good agronomic practices; environmental education; consumer education; legislation with strong repression for the infractors; routine fiscal analyses by competent official agencies, control of levels of the maximum residual limits (MRL) in foodstuffs and water for human consumption. With this end, a simple methodology, efficient and economic, was developed, based in the use of solid phase micro-extraction (SPME) for determination of pesticides (Lindane®, Aldrin®, DDE, Dieldrin®, TDE and Mirex®) in samples of water and of lettuce, using gas chromatography with electron capture detector (GC-ECD). This method can be applied in small volumes of sample (*ca.* 1,0 mL), it does not need the use of solvents and, in the multi-residue analysis there is no need to modify the ionic force or pH of the matrix. Of the analyzed samples, after screening, the organochlorine pesticide DDE was found only in the samples of lettuce, in the range 29 – 262 ng/g, with RSD average of 13 %. The accuracy of the quantification of DDE in the samples of lettuce was tested by % of recovery and comparison with an official method for determination of pesticides, when recoveries in the range 93 – 96 % with average RSD of 14 % were obtained. Using ELL extraction (official method) a value for the DDE in the four samples of lettuce in the band of 25 – 240 ng/g was found, with average RSD of 14 %, and recovery between 92 and 98 %, with RSD average of 12 %. The two methods do not differ statistically, to a level of confidence of 95 %. The presence of DDE as contaminant can be related with the application of DDT instead of DDE itself, since DDT was used world-wide in wide scale up to 1985, when its use was forbidden in Brazil. The results obtained for the lettuce samples are indicative of the environmental persistence of organochlorine pesticides.

INDICE GERAL

		Página
GLOSSÁRIO		VIII
ÍNDICE DE FIGURAS		X
ÍNDICE DE TABELAS		XIII
INTRODUÇÃO		1
Capítulo I – AGROTÓXICO		
1	INTRODUÇÃO E OBJETIVO	5
2	HISTÓRICO	11
3	DEFINIÇÃO DOS AGROTÓXICOS	13
4	CLASSIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS	15
4.1	CLASSIFICAÇÃO QUANTO AO MODO DE AÇÃO	15
4.2	CLASSIFICAÇÃO QUANTO À FINALIDADE	16
4.3	CLASSIFICAÇÃO QUANTO À TOXICIDADE	16
4.4	CLASSIFICAÇÃO QUANTO À FUNÇÃO- QUÍMICA	17
4.5	CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM A ÉPOCA DE SURGIMENTO	18
5	FORMAS DE USO	19
6	ASPECTOS TOXICOLÓGICOS	19
6.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
6.2	ALGUNS TERMOS RELACIONADOS À TOXICIDADE E AO EMPREGO DE AGROTÓXICOS	21
6.3	EFEITOS TÓXICOS DOS AGROTÓXICOS ORGANOCORADOS	22

7	ASPECTOS DA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA	23
8	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	24
9	INSETICIDAS ORGANOCLORADOS	25
9.1	GRUPO DO DDT E ANÁLOGOS	26
9.2	GRUPO DOS BHCs	28
9.3	GRUPO DOS CICLODIENOS	30
10	DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS ORGANOCLORADOS	31
10.1	EXTRAÇÃO LÍQUIDO - LÍQUIDO (ELL)	32
10.2	EXTRAÇÃO EM FLUIDO SUPERCRÍTICO (EFC)	33
10.3	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (EFS)	33
10.4	MICRO-EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (MEFS)	34
11	CONCLUSÃO	34
12	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

CAPÍTULO II: MICRO-EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA – FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES EM ANÁLISE DE ALIMENTOS

1	INTRODUÇÃO E OBJETIVO	41
2	APRESENTAÇÃO DO INSTRUMENTO	42
3	ETAPAS QUE COMPÕEM O PROCEDIMENTO MEFS	46
3.1	EXTRAÇÃO	46
3.2	DESSORÇÃO	47

4	PRINCIPAIS ASPECTOS ANALÍTICOS QUE FUNDAMENTAM A MEFS	48
5	BREVE COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE MICRO-EXTRAÇÃO E DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	51
6	VANTAGENS GERAIS DA MEFS SOBRE AS TÉCNICAS CONVENCIONAIS	52
7	APLICAÇÃO DA MEFS EM ANÁLISE DE ALIMENTOS	54
8	CONCLUSÃO	57
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

CAPÍTULO III: ESTUDOS DE OTIMIZAÇÃO – ANÁLISE DE AGROTÓXICOS POR MEFS EM AMOSTRAS DE ÁGUA E ALFACE

1	INTRODUÇÃO E OBJETIVO	69
2	MATERIAL E MÉTODOS	71
2.1	MATERIAL	71
2.1.1	EQUIPAMENTOS	71
2.1.2	ACESSÓRIOS ESPECÍFICOS PARA MEFS	71
2.1.3	VIDRARIAS E OUTROS ACESSÓRIOS DE LABORATÓRIO	71
2.1.4	REAGENTES, SOLVENTES E GASES	72
2.2	MÉTODOS	72
2.2.1	TRATAMENTO DOS MATERIAIS NÃO DESCARTÁVEIS	72
2.2.2	PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES PADRÃO DE AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS (LINDANO; ALDRIN; DIELDRIN; TDE; MIREX ; DDE)	73
2.2.3	OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA OTIMIZAÇÃO DA MEFS	73
2.2.4	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	74
2.2.5	CONDICIONAMENTO DA FIBRA PDMS-100	74
2.2.6	DETERMINAÇÃO DOS VOLUMES MOLARES DOS AGROTÓXICOS	75

2.2.7	TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS DOS DADO	75
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.	75
3.1	ESTUDO DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS PARA A OTIMIZAÇÃO DA MEFS EM AMOSTRAS DE ÁGUA E DE ALFACE	75
3.1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS PARA OS PROCEDIMENTOS PRELIMINARES DE OTIMIZAÇÃO	75
a)	Seleção da Fibra	75
b)	Condicionamento da fibra PDMS-100 – Monitoramento	76
c)	Efeito memória – Monitoramento	78
d)	Estudo do posicionamento da fibra na zona aquecida do injetor.	78
e)	Verificação dos tempos de retenção (t_R) dos agrotóxicos estudados e reprodutibilidade dos mesmos	79
f)	Coefficiente de Correlação (r) e repetitividade da sensibilidade	82
g)	Diluição de matrizes complexas	83
h)	Seleção do volume de solução-amostra (V_A)	84
i)	Seleção da temperatura de extração	84
j)	Preparo de uma nova solução padrão mista de trabalho	85
l)	Tratamento das vidrarias	85
m)	Soluções - amostras	85
3.1.2	OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE DESSORÇÃO	86
3.1.3	OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE EXTRAÇÃO	94
3.1.3.1	ESTUDO SOBRE O EFEITO DA AGITAÇÃO NA MICRO-EXTRAÇÃO DOS AGROTÓXICOS.	94
3.1.3.2	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO SOBRE A EXTRAÇÃO	101
3.1.3.3	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO TEMPO DE EXTRAÇÃO (T_E) SOBRE A MICRO-EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS	104

3.1.3.4	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA FORÇA IÔNICA SOBRE A MICRO-EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICO	113
3.1.3.5	ESTUDO DO EFEITO DO pH SOBRE A MICRO-EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS	120
4	CONCLUSÃO	127
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
CAPÍTULO IV – VALIDAÇÃO DO MÉTODO – APLICAÇÃO DOS PARÂMETROS OTIMIZADOS DA MEFS EM AMOSTRAS DE ÁGUA E ALFACE		
1	INTRODUÇÃO E OBJETIVO	131
2	MATERIAL E MÉTODO	136
2.1	MATERIAL	136
2.1.1	EQUIPAMENTOS	136
2.1.2	ACESSÓRIOS ESPECÍFICOS PARA MEFS	136
2.1.3	VIDRARIAS E OUTROS ACESSÓRIOS DE LABORATÓRIO	136
2.1.4	REAGENTES, SOLVENTES E GASES	136
2.2	MÉTODO	136
2.2.1	TRATAMENTO DOS MATERIAIS NÃO DESCARTÁVEIS	136
2.2.2	PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES PADRÃO DE AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS (LINDANO; ALDRIN; DIELDRIN; TDE; MIREX ; DDE)	136
2.2.3	OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR MEFS	137
2.2.4	CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO - LÍQUIDO (ELL).	138
2.2.5	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.	139
2.2.6	CONDICIONAMENTO DA FIBRA PDMS-100	139
2.2.7	TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS DOS DADOS.	139
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	140

3.1	ESTUDO DA PRECISÃO, LINEARIDADE, LIMITES DE DETECÇÃO E EXATIDÃO DO MEFS-ID/CGAR/DCE	140
3.1.1	PRECISÃO DAS MEDIDAS – REPETITIVIDADE	141
3.1.2	LINEARIDADE	143
3.1.3	LIMITE DE DETECÇÃO	147
3.1.4	EXATIDÃO - TESTE DE RECUPERAÇÃO	149
3.1.5	CONCLUSÕES	150
3.2	ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE ÁGUA E DE ALFACE COLETADAS – IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO PELO MÉTODO MEFS	150
3.2.1	ETAPA INICIAL	150
3.2.2	ETAPA DE IDENTIFICAÇÃO DO ANALITO DETECTADO NAS AMOSTRAS DE ALFACES COLETADAS	152
3.2.3	QUANTIFICAÇÃO E TESTE DE RECUPERAÇÃO	153
3.3	ANÁLISE DE <u>DDE</u> PELO MÉTODO CONVENCIONAL (<u>ELL</u>) NAS AMOSTRAS DE ALFACE COLETADAS	156
3.3.1	ETAPA DA EXTRAÇÃO DO MÉTODO CONVENCIONAL ELL	156
3.3.2	ETAPA QUALITATIVA POR ELL – CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE <u>DDE</u> NAS ALFACES	157
3.3.3	PARÂMETROS QUANTITATIVOS DO MÉTODO ELL – LINEARIDADE, PRECISÃO E LIMITE DE DETECÇÃO PARA ANÁLISE DE <u>DDE</u> EM ALFACE.	158
3.3.4	QUANTIFICAÇÃO DE <u>DDE</u> E TESTE DE RECUPERAÇÃO POR ELL NAS AMOSTRAS DE ALFACE	159
3.4	COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO MEFS E ELL PARA MATRIZ ALFACE	160
3.4.1	COMPARAÇÃO ENTRE AS QUANTIFICAÇÕES DO <u>DDE</u> NAS AMOSTRAS DE ALFACE	160

3.4.2	3.4.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS RECUPERAÇÕES PARA ANÁLISE DE <u>DDE</u> EM ALFACE	161
3.4.3	COMPARAÇÃO ENTRE LINEARIDADE, PRECISÃO E LIMITE DE DETECÇÃO NA ANÁLISE DE <u>DDE</u> EM ALFACE, POR MFES E ELL	162
4	CONCLUSÃO	164
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165
	CONCLUSÃO FINAL	167

GLOSSÁRIO

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOC = agrotóxico organoclorado
BHC= HCH = hexacloro ciclohexano
BTEX = benzeno, tolueno, etilxileno, xileno
ELL = extração líquido-líquido
CAR = carboxen
CEAGESP= Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais do Estado de S.P.
CG = cromatografia gasosa
CGAR = cromatografia gasosa de alta resolução
CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência
CL = cromatografia líquida
COV = composto orgânico volátil
CV = coeficiente de variação
CW = Carbowax
2,4 D = 2,4 diclorofenoxiacético
DDA = dicloro-difenil-acético
DDD = DDD dicloro difenil dicloroetano =TDE = tetracloro difenil etano .
DDE = dicloro difenil dicloroetano
DDT = dicloro difenil tricloroetano.
DIC = detector de ionização de chamas
DL₅₀ = dose letal de 50% (dose para matar 50% de uma população)
Dp = desvio padrão dos sinais da solução-branco
DVB = divinilbenzeno
DCE =detector de captura de elétrons
DEM =detector de espectrometria de massas
EFC = extração em fluido supercrítico
EFS = extração em fase sólida
EFS/CG = extração em fase sólida/cromatografia gasosa
ELL = extração líquido-líquido
EM = espectrometria de massas
FAO = Food and Agriculture Organization of the United Nations
HCB = hexacloro benzeno
HCH = 1,2,3,4,5,6-hexacloro ciclo hexano = BHC
HS = *headspace*, que significa atmosfera confinada em cima da amostra.
ID = imersão direta
IDi = ingestão diária
IDA = ingestão diária aceitável
INCQS = Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IUPAC = International Union of Pure and Applied Chemistry
K_{F/A} = coeficiente de distribuição fibra/água
K_{O/A} = coeficiente de partição octanol/água
LD = limite de detecção
LMR limite máximo de resíduo

MEFS = micro-extração em fase sólida
MEFS/CL = micro-extração em fase sólida/cromatografia líquida
MEFS-HS = micro-extração em fase sólida por *headspace*.
MEFS-HS/CGAR = micro-extração em fase sólida por *headspace*/ cromatografia gasosa de alta eficiência
MEFS-ID = micro-extração em fase sólida por imersão direta
MEFS/CG = micro-extração em fase sólida/cromatografia gasosa
MEFS/CGAR/DCE = micro-extração em fase sólida/cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons
MEFS/CLAE = micro-extração em fase sólida/cromatografia gasosa de alta eficiência
N = número de repetições experimentais.
OMS = Organização Mundial da Saúde
OPAS = Organização Pan Americana de Saúde
PA = poliacrilato
PAHs = hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
PARA Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos
PCC = pentaclorociclohexeno
PDMS = polidimetil siloxano
PND = Plano Nacional de Desenvolvimento
PRONAF = Programa Nacional de Fortalecimento a Agricultura Familiar
r = coeficiente de correlação
R = recuperação
rpm = rotações por minuto
S = sensibilidade do método (coeficiente angular)
SINDAG = Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Agrícolas.
SNITF = Sistema Nacional de Informação Tóxico-Farmacológica
T = temperatura
 t_E = tempo de extração
 t_D = tempo de dessorção
 t_R = tempo de retenção
2,4,5 T = 2,4,5 triclorofenoxiacético
TDE = tetracloro difenil etano = DDD dicloro difenil dicloroetano
 V_A = volume da amostra
 V_F = volume da fibra

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I		Página
Figura 1	Estrutura química do DDT e de alguns análogos	28
Figura 2	Estrutura química: (A) BHC (1,2,3,4,5,6-hexacloro ciclo hexano = HCH); (B) Lindano (?-BHC)	29
Figura 3	Estrutura química do Aldrin e do Dieldrin	30
Figura 4	Estrutura química do Mirex ou dodeclorano	31
CAPÍTULO II		
Figura 5	Vista externa (A) e interna (B) do instrumento para MEFS	42
Figura 6	Parte removível do instrumento MEFS com a fibra escondida no interior da agulha (A); com a fibra exposta (B); parte inferior ampliada (C)	43
Figura 7	Esquema seqüencial da extração MEFS-ID	47
Figura 8	Esquema seqüencial da dessorção em CG	48
CAPÍTULO III		
Figura 9	Cromatograma após corrida-branco do primeiro condicionamento da fibra; $t_D = 5$ min a 250°C	77
Figura 10	Cromatograma após corrida-branco do último condicionamento da fibra; $t_D = 5$ min a 250°C	78
Figura 11	Cromatograma obtido a partir da injeção de $1,8 \mu\text{L}$ de solução padrão metanólica mista a $0,5 \mu\text{L}/\text{mL}$	80
Figura 12	Cromatograma obtido a partir da MEFS-ID em água fortificada a $10\text{ng}/\text{mL}$; $t_E = 15$ min e $t_D = 60$ s (250°C)	82
Figura 13	Influência do tempo de dessorção (250°C) dos agrotóxicos, na obtenção dos sinais analíticos, na amostra fortificada de água a $10 \text{ng}/\text{mL}$, após MEFS-ID em $t_E = 15$ min e PDMS-100, sob agitação por 1.200rpm	87

Figura 14	Influência do tempo de dessorção (250°C) dos agrotóxicos na obtenção dos sinais analíticos, na amostra fortificada de extrato aquoso de alface a 10 ng/mL, após MEFS-ID em $t_E=15$ min e PDMS-100, sob agitação por 1.200 rpm	92
Figura 15	Influência da agitação sobre a micro-extração dos agrotóxicos na amostra fortificada de água a 10 ng/mL, após MEFS-ID, em $t_E=30$ min e PDMS-100 e $t_D = 8$ min (250°C) sob agitação foi de 1.200 rpm	95
Figura 16	Influência da agitação sobre a micro-extração dos agrotóxicos na amostra de extrato aquoso de alface fortificada a 10 ng/mL, após MEFS-ID, em $t_E=30$ min e PDMS-100, sob agitação por 1.200 rpm e $t_D = 8$ min (250°C)	99
Figura 17	Influência da agitação sobre a micro-extração dos agrotóxicos na amostra fortificada de água a 10 ng/mL, após MEFS-ID, em $t_E=30$ min e PDMS-100, sob agitação na faixa de 0 a 1.200 rpm e $t_D = 8$ min (250°C)	102
Figura 18	Influência da agitação sobre a micro-extração dos agrotóxicos na amostra no extrato aquoso de alface fortificada a 10 ng/mL, após MEFS-ID, em $t_E=30$ min e PDMS-100, sob agitação na faixa de 0 a 1.200 rpm e $t_D = 8$ min (250°C)	103
Figura 19	Influência do tempo de extração (min) na micro-extração dos agrotóxicos estudados, em solução-amostra de água fortificada a 10 ng/mL (PDMS 100 μ m ; $t_D = 120$ s (250°C); agitação 1.200 rpm)	105
Figura 20	Influência do tempo de extração (min) na micro-extração dos agrotóxicos estudados, em extrato aquoso de alface fortificado a 10 ng/mL (PDMS 100 μ m; $t_D= 120$ s (250°C); agitação 1.200 rpm)	111
Figura 21	Média das áreas obtidas para cada agrotóxico extraído na amostra de água fortificada (10 ng/mL), com adições de NaCl: 0; 5; 15; 30 % (m/v) e saturada, com extração por PDMS-100 sob agitação a 1.200 rpm com $t_E = 20$ min e $t_D = 120$ s (250°C)	114
Figura 22	Média das áreas obtidas para cada agrotóxico extraído do extrato aquoso de alface fortificada (10 ng/mL), com adições de NaCl: 0; 15; 30 % (m/v), com extração por PDMS-100 sob agitação a 1.200 rpm com $t_E = 20$ min e $t_D = 120$ s (250°C)	118
Figura 23	Cromatogramas de análise por ID-MEFS-CGAR-DCE de agrotóxicos na solução-amostra de água fortificada (10 ng/mL) com extração por PDMS-100 sob agitação a 1.200 rpm com $t_E = 20$ min e $t_D = 120$ s (250° C). (A) Sem NaCl; (B) Saturada de NaCl.	119

Figura 24	Média das áreas obtidas para cada agrotóxico extraído da solução-amostra de água fortificada (10 ng/mL) em diferentes valores de pH: 4; 6; 7 e 9 (PDMS 100µm ; $t_E = 20$ min, sob agitação, por 1.200 rpm ; $t_D = 120$ s a 250°C)	121
Figura 25	Média das áreas obtidas para cada agrotóxico extraído do extrato aquoso de alface fortificada (10 ng/mL) em diferentes valores de pH: 4; 6; 7 e 9 (PDMS 100µm ; $t_E = 20$ min, sob agitação, por 1.200 rpm ; $t_D = 120$ s a 250°C)	125
Figura 26	Figura com os 3 cromatogramas de numero 18 (a) ; (b) e (c), em pH 4,0 ; 6,0 e 9,0	126
CAPÍTULO IV		
Figura 27	Cromatograma obtido a partir da MEFS-ID/CGAR/DCE em amostra de água não fortificada $t_E = 20$ min sob agitação a 1.200 rpm; $t_D = 120$ s (250°C)	151
Figura 28	Cromatograma obtido a partir da MEFS-ID/CGAR/DCE em amostra de alface não fortificada $t_E = 20$ min sob agitação a 1.200 rpm; $t_D = 120$ s (250°C)	152
Figura 29	Cromatograma obtido a partir da MEFS-ID/CGAR/DCE em amostra de alface fortificada com Dieldrin a 1 ng/mL ($t_R = 21,38$ min) $t_E = 20$ min, sob agitação a 1.200 rpm; $t_D = 120$ s (250°C)	152
Figura 30	Cromatograma obtido a partir da MEFS-ID/CGAR/DCE em amostra de alface fortificada com DDE a 1 ng/mL $t_E = 20$ min, sob agitação a 1.200 rpm; $t_D = 120$ s (250°C)	153
Figura 32	Cromatograma obtido a partir da ELL/CGAR/DCE em amostra de alface não fortificada	157
Figura 33	Cromatograma do extrato de alface obtido por ELL, após co-injeção com Dieldrin ($t_R = 21, 31$ min) e análise por CGAR/DCE, indicando a presença de DDE ($t_R = 20,74$ min) como contaminante	157
Figura 34	Cromatograma do extrato de alface obtido por ELL, após co-injeção com DDE ($t_R = 20,74$ min) e análise por CGAR/DCE	158
Quadro 1	Concentração e volume da solução padrão mista de trabalho utilizada para o preparo da solução-amostra de água fortificada na faixa de 0,5 a 3,5 (ng/mL), para estudo da validação da MEFS.	144
Quadro 2	Concentração e volume da solução padrão mista de trabalho utilizada para o preparo do extrato aquoso de alface fortificado na faixa de 0,6 a 36,8 (ng/mL), para estudo da validação da MEFS	145

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Resultados obtidos pelo projeto PARA com os alimentos analisados em 2002 e 2003	10
Tabela 2	Cronograma sobre o surgimento e uso dos principais agrotóxicos, até a 2ª Guerra Mundial	12
Tabela 3	Cronograma sobre o surgimento e uso dos principais agrotóxicos, após a 2ª Guerra Mundial	14
Tabela 4	Grupos de agrotóxicos quanto ao destino específico	16
Tabela 5	Classificação dos agrotóxicos quanto à toxicidade	17
Tabela 6	Classificação cronológica dos agrotóxicos	19

CAPÍTULO II

Tabela 7	Revestimentos comercialmente disponíveis e indicações de uso	45
Tabela 8	Extração EFS vs. Micro-Extração MEFS (só com superfície sólida)	53

CAPÍTULO III

Tabela 9	Programação da temperatura do forno usada para análise dos organoclorados em CGAR/DCE	74
Tabela 10	Médias (N = 3) dos tempos de retenção (t_R) e respectivos coeficientes de variação obtidos para cada agrotóxico vs injeção convencional	80
Tabela 11	Médias (N = 3) dos tempos de retenção (t_R) e respectivos coeficientes de variação obtidos para cada agrotóxico vs MEFS-ID	81
Tabela 12	Médias (N=3) das curvas de calibração e respectivos coeficientes de correlação (r) e coeficientes de variação (%) para a sensibilidade da curva de cada analito	83
Tabela 13	Propriedades físicas dos agrotóxicos estudados	107

CAPÍTULO IV

Tabela 14	Condições de extração, dessorção e cromatográficas de análise para determinação de agrotóxicos organoclorados em amostras de água e alface, para validação do método MEFS-ID/CGAR/DCE	140
Tabela 15	Médias (N = 3) dos tempos de retenção (tr) obtidos para cada agrotóxicos e respectivos coeficientes de variação (%CV) para as soluções-amostra de água e extratos aquosos de alface fortificados, por MEFS-ID/CGAR/DCE	141
Tabela 16	Coeficientes de variação (%CV) do método de análise por MEFS-ID/CGAR/DCE obtido para cada agrotóxico nas soluções-amostras fortificadas de água ultrapura e extrato de alface (N = 7)	142
Tabela 17	Equações de linearidade ($y = ax + b$) e respectivos coeficientes de correlação (r) obtidos pela análise por MEFS-ID/CGAR/DCE de cada agrotóxico em solução-amostra de água ultrapura fortificada e em extrato aquoso de alface fortificada (N = 3)	1146
Tabela 18	Limites de detecção (L.D.) obtidos da análise por MEFS-ID/CGAR/DCE para agrotóxico organoclorado nas amostras de água e alface fortificadas (N = 7)	148
Tabela 19	Média das recuperações (%R) e coeficientes de variação (%CV) das análises por MEFS-ID/CGAR/DCE dos seis agrotóxicos organoclorados estudados, em amostras de água e alface fortificadas	149
Tabela 20	Concentração de DDE nas amostras de alface analisadas por MEFS-ID/CGAR/DCE (N=3) e respectivos coeficientes de variação (CV)	154
Tabela 21	Médias das recuperações de DDE em amostras de alfases fortificadas, obtidas a partir das 3 fortificações, pelos métodos de extração MEFS e respectivos coeficientes de variação (%CV) (N = 3)	156
Tabela 22	Concentração de DDE nas amostras de alface analisadas por ELL (N=3) e respectivos coeficientes de variação (%CV)	160
Tabela 23	Médias das recuperações de DDE em amostras de alfases fortificadas, obtidas a partir das 3 fortificações, pelo método de extração ELL e respectivos coeficientes de variação (%CV) (N = 3)	160
Tabela 24	Comparação entre os valores médios dos teores (N=3) de DDE em alface obtidos pelos métodos de extração por MEFS e ELL	161

Tabela 25	Valores médios das recuperações de DDE em amostras de alfaces fortificadas, obtidos a partir das 3 fortificações, pelos métodos de extração por MEFS e ELL e respectivos coeficientes de variação (%CV)	162
Tabela 26	Comparação de linearidade, precisão e limite de detecção (L.D.) entre os métodos MEFS e ELL aplicado na determinação de DDE em alface	162

INTRODUÇÃO

Resíduos de agrotóxicos nos alimentos podem causar problemas de saúde pública, além de ser um fator adverso à exportação, quando em níveis acima de tolerâncias internacionalmente aceitas. Sabe-se que no Brasil são utilizados inúmeros produtos químicos para controlar as pragas agrícolas. A grande questão é saber se os intervalos de segurança e se as concentrações máximas estão sendo obedecidas. Apesar de os agrotóxicos organoclorados terem sido proibidos desde 1985, sua utilização no passado, durante muitos anos, deixou resíduos no solo que podem ser estáveis por mais de 20 anos e transportados por correntes de ar e marítimas para locais distantes de onde foram liberados. Muitos desses pesticidas organoclorados são potencialmente carcinogênicos (Lindano, Aldrin, Eldrin, Dieldrin, entre outros) e considerados poluentes orgânicos persistentes. Alguns organofosforados ainda são usados intensamente nas lavouras. Estes além de serem letais em doses muito mais baixas do que as dos organoclorados, ao se degradarem, produzem metabólitos que, muitas vezes, possuem maior toxicidade. Em São Paulo, na década de 1960, casos de contaminação de tomates por compostos organomercúricos foram registrados e, apesar do seu uso ter sido proibido, surgiram novos casos de contaminação em 1989 devido ao uso clandestino desta classe de fungicida .

No Brasil, mesmo nos supermercados das pequenas cidades, a seção de produtos naturais vem ganhando espaço, crescendo em volume e em opções de compra. Sistemas de produção que utilizam altas doses de agrotóxicos poderão fracassar num futuro próximo, frente às crescentes exigências do mercado consumidor. A manutenção de modelos de produção, não compatíveis com a nova ordem mundial de preservação do meio ambiente e melhoria da qualidade de vida, pode acarretar perdas de divisas e aumento dos gastos públicos. As perdas de divisas podem decorrer das barreiras fitossanitárias levantadas pelos países importadores. Os programas governamentais de estímulo às exportações não podem deixar de considerar a preservação ambiental e a segurança alimentar, como componentes estratégicos de competitividade. São crescentes as reivindicações para reduzir os níveis máximos aceitáveis de resíduos de agrotóxicos presentes nos alimentos. Recentemente, na União Européia, os níveis máximos aceitáveis de resíduos de agrotóxicos foram fixados em valores abaixo dos níveis estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*, numa clara demonstração da tendência de demanda para o próximo milênio. A insistência em se manter modelos de produção – não compatíveis com a nova ordem mundial, de preservação do meio ambiente e segurança alimentar – pode, então, impor fortes perdas econômicas ao País. O aumento nos gastos públicos decorrentes de programas de saúde e aposentadorias precoces de trabalhadores rurais, por invalidez ou contaminação pelo uso inadequado e indiscriminado de agrotóxicos, também constitui um forte apelo na busca de um novo modelo de produção agrícola. O estabelecimento de normas rígidas de fiscalização e controle fitossanitário nas importações de produtos frescos, para impedir a entrada de pragas e doenças exóticas no País e a sua disseminação, também merece especial atenção. É preciso promover um programa de conscientização coletiva, no sentido de valorizar a qualidade de vida da população .

Visando urgência no controle do uso de agrotóxicos no Brasil através do monitoramento dos resíduos remanescentes nos alimentos, com âmbito nacional, em junho de 2001, um Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) foi instalado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em parceria com o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ). Vários estados participaram deste programa e os resultados gerados, no período de 2001/2002 e 2002/2003 comprovam que nem sempre os vegetais são alimentos isentos de contaminação.

Diante desse quadro preocupante, os consumidores mais informados procuram, cada vez mais, evitar o consumo das culturas mais visadas. Por outro lado, sabemos que tais alimentos são fontes de nutrientes e, assim, importantes na dieta humana.

Tal fato influencia de modo adverso a sua qualidade podendo causar danos potenciais à saúde. Todos estes fatos servem para intensificar a necessidade da continuidade de programas de monitoramento como o PARA, realizado pela ANVISA, com crescente número de parcerias interlaboratoriais além de pesquisas que objetivem o desenvolvimento e a validação de métodos mais rápidos e econômicos de análise de resíduos de agrotóxicos, para garantir melhor qualidade da água e dos alimentos consumidos pela população.

Para a análise laboratorial de resíduos de agrotóxicos existe uma variedade de métodos que pode ser encontrada facilmente na literatura. Tais métodos são compostos, essencialmente, das etapas de extração do analito de sua matriz, sua concentração, identificação e determinação de seu teor. Dentre as técnicas de extração que fazem uso de uma fase sólida para adsorção dos analitos, destaca-se a micro-extração em fase sólida (MEFS) por ser funcional e não necessitar de uso de solventes (geralmente tóxicos). A MEFS é considerada uma micro-técnica de extração e de pré-concentração de analitos, pois esses processos são realizados em escala muito reduzida. A técnica de MEFS foi desenvolvida entre 1989 e 1990 pelo Prof. Janusz Pawliszyn, da Universidade de Waterloo, em Ontário (Canadá), para uso em cromatógrafo gasoso (CG), em análises de poluentes orgânicos voláteis e semivoláteis em águas. Desde então, foram publicados vários tratamentos teóricos que fundamentam a técnica além de trabalhos sobre a aplicação da MEFS em análises de amostras ambientais, de alimentos, forensicas e botânicas, incluindo o uso de cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). Métodos baseados em MEFS-CG têm sido utilizados nos últimos anos por sua simplicidade, rapidez e economia nas análises de agrotóxicos.

A necessidade de monitorar resíduos de agrotóxicos em alimentos, tem levado, nos últimos anos, ao desenvolvimento de técnicas de extração multi-resíduo em várias matrizes, com possibilidades de redução de consumo de solventes, de custos e de tempo de análise. Em particular, a extração em fase sólida (EFS) é uma técnica mais utilizada que a extração convencional líquido-líquido (ELL), pois, apesar de também envolver o uso de solventes, mas em menor quantidade, é muito mais econômica e menos propícia à contaminação. Como uma alternativa, mais rápida e livre de solventes orgânicos, para substituir estas técnicas de extração, encaixa-se a MEFS para ser utilizada em métodos de análise de agrotóxicos, ocorrendo entretanto a necessidade de ser adaptada para cada tipo de matriz.

Considerando todos estes fatos, este trabalho tem como objetivo a otimização e validação de um método de análise de agrotóxicos organoclorados por MEFS-CG e sua aplicação em amostras de água e de alfaces a fim de estabelecer a qualidade dessas amostras. Para isto, as seguintes etapas foram desenvolvidas:

- 1) Estudo da otimização dos principais parâmetros que afetam a eficiência da extração de agrotóxicos organoclorados por MEFS para subsequente análise em cromatógrafo gasoso equipado com detector de captura de elétrons (MEFS-CG-DCE).
- 2) Após a escolha das condições acima, estudar a viabilidade de determinar os agrotóxicos organoclorados simultaneamente usando a MEFS-CG-DCE, de acordo com a sensibilidade, a reprodutibilidade e o limite de detecção do método (por tratamentos estatísticos) e quantificação nas amostras pelo método da adição padrão.
- 3) Comparar a MEFS-CG-DCE com ELL-CG-DCE, quanto ao limite de detecção, custo, facilidade operacional, recuperação, precisão e exatidão.

CAPÍTULO I

AGROTÓXICOS

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

A função do agrotóxico é proteger a agricultura contra qualquer praga que transmita doença animal ou humana ou que cause quaisquer danos à produção, processamento, estocagem, transporte ou comercialização de alimentos e outros produtos agrícolas e agroindustriais (OPAS/OMS, 1996).

Os agrotóxicos têm sua importância relacionada com a sua função, influenciando positivamente na produção direta dos alimentos, contrapondo-se com sua toxicidade, como será verificado mais adiante.

O uso de agrotóxicos, como um fator adverso à segurança alimentar e ambiental, é amplamente questionado e discutido, uma vez que um dos principais desafios de nossa sociedade, atualmente, é manter o equilíbrio entre crescimento sócio-econômico e proteção do meio ambiente voltado para o alcance de uma melhor qualidade de vida.

Sua difusão ganhou dimensões muito importantes na década de 70 – época da chamada Revolução Verde – que fez com que os países mais ricos optassem por uma agricultura mais moderna, intensiva e dependente destes insumos (YOKOMIZO *et al.*, 1985).

De acordo com El Sebae (1997), cerca de 50% da produção agrícola mundial são oriundas de países desenvolvidos, cabendo a estes o maior consumo de agrotóxicos.

Já em 1962, o seu uso foi advertido em uma publicação de Rachel Carson, uma ambientalista importante, onde menciona que com pouca ou nenhuma pesquisa prévia sobre seus efeitos no solo, na água, nos animais selvagens e sobre o próprio homem, permitiu-se que esses produtos químicos fossem utilizados (HISTÓRIA, 2003).

O Brasil, onde a Revolução Verde chegou um pouco mais tarde, está, atualmente, entre os principais países que mais utilizam agrotóxico no mundo.

A razão do uso exagerado de agrotóxicos neste país está atrelada às políticas governamentais de incentivo, às ações propagativas dos setores agroquímicos e ao modelo de agricultura industrial (agro-negócio). Tal modelo é instável, pois se compõe de monocultura, geralmente de variedades mais produtivas, e uso de adubação química, o que facilita a propagação de pragas. Com surgimento de danos, causados pelas pragas, torna-se necessário o uso de agrotóxicos que, por sua vez, provocam novos desequilíbrios, gerando novas pragas, que exigem novos agrotóxicos, num ciclo inexorável que parece não ter fim.

Neste contexto, surge, então, o argumento, tão defendido por empresas multinacionais produtoras de agrotóxicos, de que a agricultura, a horticultura, a silvicultura e as criações de animais só são possíveis com o uso destes produtos e que, se assim não fosse, a humanidade passaria fome por falta de alimentos.

Este argumento passa a ser tão apregoadado, defendido e difundido, que acaba por ser aceito, sem questionamentos, pelos profissionais da área (HISTÓRIA, 2003).

Como se sucedeu nos países desenvolvidos, com a Revolução Verde, o agricultor brasileiro preferiu acreditar que nunca mais perderia uma safra inteira com o ataque de pragas se conseguisse adquirir e usar os agrotóxicos em suas plantações.

Realmente, os agrotóxicos ajudaram a aumentar a produção agrícola no mundo inteiro, diminuindo as perdas. Mas, com o tempo, junto aos benefícios gerados, efeitos adversos foram surgindo devido a uma série de fatores. Notou-se, por exemplo, que o uso abusivo de agrotóxicos além de tornar muitos insetos e microrganismos mais resistentes, aumenta os riscos de destruir os inimigos naturais da praga daquela plantação (ALMEIDA, 2000 ; MACHADO NETO, 1990).

A incidência de insetos e fungos, que surgem por maus tratos culturais e emprego deficiente de mecanismos de auto-preservação, é um dos principais desafios da indústria alimentícia, a mais importante do setor agrário, isto apesar de seu grande desenvolvimento e aplicação de técnicas modernas (CHITARRA, 2002).

De acordo com Chitarra (2002), a comercialização de produtos *in natura*, notadamente, frutas e hortaliças, ainda é incipiente, principalmente nos países tropicais devido a perdas, chegando a atingir em nosso país até 60% em alguns casos.

Além de perdas, soma-se o fato de que, freqüentemente, os produtores adquirem e aplicam fungicidas sem haver identificado os patógenos e pragas adequadamente, o que aumenta os custos sem qualquer efeito prático de controle (HENZ, 2002).

Apesar das perdas, a produção de frutas e hortaliças no Brasil vem se superando em termos mundiais e, segundo Benato (2002), isto significa que, em paralelo, é também grande a possibilidade de aumentar ainda mais o consumo de agrotóxico – em escala ainda maior do que a que já vem ocorrendo – se tais processos "modernos" de agricultura não forem substituídos por alternativos que criem mecanismos de resistência a pragas.

A partir da década de 90 a agricultura brasileira cresceu, se modernizou ainda mais e passou a utilizar mais fertilizantes e agrotóxicos. A quantidade comercializada de agrotóxico de 1992 a 2000, nem sempre controlada pelos órgãos oficiais, teve um aumento de 21,6%. Não se sabe, entretanto, em nível nacional, em que escala a qualidade das águas e dos produtos que chegam à mesa do consumidor está comprometida pelo uso indiscriminado dos agrotóxicos (COMÉRCIO, 2002).

Segundo Fowler e colaboradores (1989), os resultados de uma pesquisa finalizada em 1984 foram estarrecedores e contribuíram decisivamente para que os produtos organoclorados fossem proibidos no País. Com base no monitoramento, feito entre 1976 e 1984 a partir de 1.816 amostras em 12 das 16 bacias hidrográficas do Paraná, constatou-se que 91,4% das análises realizadas em amostras de água *in natura* de mananciais de abastecimento possuíam resíduos de, pelo menos, um agrotóxico.

De acordo com estes mesmos autores, foram estudados 11 produtos organoclorados (BHC = HCH = Hexaclorociclohexano; Lindano; DDE = Diclorodifenil dicloroetano; Aldrin; DDT = Diclorodifenil tricloroetano; TDE = Tetraclorodifenil etano; Heptaclor; Clordane; Canfecloro; Dieldrin; Endrin); 04 organofosforados (Malathion, Parathion, Metil-parathion e Ethion), 01 derivado do éster do ácido sulfuroso de um dial cíclico (Endosulfan) e 01 do grupo das dinitroanilinas (Trifuralin).

Das 267 amostras coletadas, o BHC esteve presente em todos os municípios, seguido pelo Lindano (103), o DDT (41) o Aldrin (15), o TDE (15), o DDE (12), o Heptaclor (05), o Chlordane (02), o Endrin (02) e o Dieldrin (01). Mesmo nas amostras de água tratadas os problemas eram extremamente graves já que todos estes produtos são organoclorados.

Fowler e colaboradores (1989) citam que dados da EMATER/RS formaram um diagnóstico que deu origem ao programa de micro-bacias na área do Guaíba (RS) mostrando também uma situação preocupante. As sub-bacias do Alto Jacuí e do Baixo Jacuí consumiam em conjunto nada menos que 5 kg de agrotóxicos por hectare e por ano nas culturas de soja, fumo, videira, tomate, macieira, arroz, batata, trigo, milho e feijão. Para que se tenha uma idéia do que isso representa, a contaminação generalizada das águas pode ser alcançada com níveis de agrotóxicos por hectare, quase sempre, abaixo dos 3 quilos por ano.

A existência de resíduos de agrotóxicos na água e no solo foi também constatada no Estado do Paraná, na avaliação do programa de micro-bacias feita em 1997. Os resultados das análises da água neste estudo não mostram a presença dos princípios ativos anteriormente citados, mas resta saber se isso corresponde a um avanço com relação ao que ocorria há quinze anos atrás, ou se é o reflexo da falta de sensibilidade dos instrumentos de medida aos novos componentes dos pesticidas hoje mais usados (YUDELMAN *et al.*, 1998).

De acordo com Guivant (1994), a área de horticultura da Grande Florianópolis, mostra que "é generalizado entre os agricultores a pulverização regular, 3 vezes por semana, no mínimo, com insumos que só deveriam ser aplicados uma vez". Também no Sudeste, a partir dos anos 70 os agrotóxicos passaram a ser aplicados em doses exageradas, sem obedecer às normas e critérios de segurança exigidos nos países do primeiro mundo. Desde então, tornaram-se muito mais frequentes os casos de contaminação de recursos hídricos, dos solos e de cadeias alimentares, incluindo os animais e o próprio homem.

Os alimentos também estão sujeitos às contaminações provocadas pelas práticas agrícolas convencionais. Ao pesquisar 22 frutas comercializadas na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo (CEAGESP), o Instituto Biológico, vinculado à Secretaria de Agricultura e Abastecimento, concluiu que o morango é uma das frutas que mais apresentam resíduos de agrotóxicos. No período de 1990 a 1995, 5,3% das amostras analisadas continham resíduos de pesticidas acima dos níveis permitidos. E 22,4% das amostras continham resíduos de produtos cuja comercialização e uso agrícola já foram proibidos no país em função de sua toxicidade.

Os casos mais graves ocorrem nas culturas de banana, cebola, cenoura, melancia, morango, pêssego, tomate, alface e uva (CORDEIRO *et al.*, 1996).

Os fatores que têm levado ao aumento no consumo de agrotóxicos no mundo todo se resume em um "viés químico" que presidiu a promoção da mudança técnica junto aos agricultores: "Durante anos, muitos governos e agências internacionais comprometeram-se com soluções agro-químicas para elevar os rendimentos, promovendo um pacote padronizado que incluía fertilizantes e pesticidas [...]". Esta orientação torna bastante frágil o argumento, muito freqüente, de que as contaminações com pesticidas decorrem, fundamentalmente, de mau uso por parte dos agricultores (YUDELMAN *et al.*, 1998).

Na verdade, as peças publicitárias contribuíram também para enfatizar o caráter inócuo dos pesticidas, indispensável para a obtenção de bons rendimentos e, quase nunca, convidam à prudência em sua utilização. Embora, em princípio, os agrotóxicos devam ser utilizados mediante um receituário fornecido por um engenheiro agrônomo, em qualquer canal de televisão que transmita para áreas rurais, pode-se assistir propagandas voltadas aos agricultores (e não aos agrônomos) enaltecendo as virtudes dos agrotóxicos. Não é de se estranhar que, diante da situação atual, prevaleça uma utilização de agrotóxicos bem acima do postulado pelas próprias recomendações técnicas existentes (YUDELMAN *et al.*, 1998).

Na realidade, não se pode prescindir do uso de agrotóxicos na agricultura química, pois o sistema foi planejado para que se faça uso deles, como complemento indispensável para um sistema de extrema simplificação e instabilidade ecológica (monoculturas). No entanto, com algumas práticas simples pode-se reduzir o volume destes para menos da metade, para menos de um terço e finalmente para um mínimo ocasional, o que é desejável sob todos os aspectos econômicos sociais e ecológicos. Quando isto ocorrer, a agricultura deixará de ser química para ser integrada como etapa intermediária e finalmente orgânica. Enquanto isto, vem ocorrendo a passos lentos, as conseqüências ecológicas, econômicas e sociais do uso abusivo desses produtos em nosso país (YUDELMAN *et al.*, 1998).

Como contraponto do descaso em relação às precauções no manejo dos agrotóxicos, a observância da dosagem perfeita, do modo de aplicação e do tempo de carência, permite que tanto o agricultor como o meio ambiente e toda a população, não sofram com os danos potenciais que o seu uso inadequado oferece. Deste modo, torna-se prioritário que sejam realizadas análises rotineiras para o monitoramento dos níveis residuais de agrotóxicos em águas e em alimentos, cujos LMR (Limite Máximos de Resíduos) são estabelecidos e controlados por órgãos públicos oficiais, objetivando a proteção da saúde pública.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) implantou, em 2000, um programa, denominado de Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA), em parceria com as Vigilâncias Sanitárias Estaduais e com o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), com o objetivo de estabelecer um monitoramento constante em todo o país, orientar a fiscalização no campo, estabelecer políticas de controle do uso indiscriminado destes produtos e de munir os consumidores de informações para que sejam exigidos produtos de melhor qualidade.

De acordo com informações da Acessoria de Imprensa da ANVISA (BRASIL, 2003), os resultados do primeiro ano do programa PARA, 2001/2002, indicaram que das 408 amostras analisadas (alface, banana, batata, cenoura, laranja, maçã, mamão, morango e tomate), em 224 amostras (55%) foram encontrados resíduos de agrotóxicos. E, destas 52% apresentaram LMR em desacordo com os valores estabelecidos; 17% resíduos proibidos e 41% de resíduos não indicados (não autorizados) para as culturas analisadas. De todos, o tomate foi o que se apresentou mais contaminado (98% das amostras), seguido pelo morango (94%) e pelo mamão (78%).

Já os resultados do segundo ano do projeto PARA, 2002/2003, apontaram dados positivos para o consumidor. Dos nove alimentos analisados – alface, banana, batata, cenoura, laranja, maçã, mamão, morango e tomate – sete obtiveram melhoria significativa. O maior avanço foi constatado com o tomate, que não apresentou contaminação, ocorrendo, entretanto, aumento no caso do mamão e do morango (BRASIL, 2004a).

Segundo o gerente geral de toxicologia da ANVISA, Luiz Cláudio Meirelles, com as culturas, em que se observou aumento de resíduos, será realizado um trabalho de informação e esclarecimento para os setores da agricultura, de forma a evitar futuras irregularidades (BRASIL, 2004a).

As análises feitas, 2002/2003, permitiram detectar a presença de resíduos de agrotóxicos acima do LMR e a utilização de agrotóxicos não autorizados para determinadas culturas. Das 1.369 amostras totais analisadas, 12,24% apresentaram irregularidades, sendo que 89% das ocorrências dizem respeito ao uso de agrotóxicos não permitidos (BRASIL, 2004a).

Meirelles destaca que a Agência está preocupada em relação a estes produtos, que apresentam resíduos de agrotóxicos acima do permitido ou que não possuem autorização para a cultura em que foi encontrado.

Na **Tabela 1** podem ser visualizados os resultados dos alimentos analisados em 2003, na execução do projeto PARA.

A ANVISA atua junto a outros órgãos, na definição de estratégias para realização de estudos de resíduos nas culturas que apresentam poucas opções de agrotóxicos, de modo a permitir ao governo uma base técnica para tomada de decisões, bem como atender ao setor agrícola com produtos eficientes para o controle das pragas e doenças, sem afetar a saúde da população (BRASIL, 2004a).

É de grande importância o estudo exaustivo para monitorar melhor os resíduos de agrotóxicos em águas e alimentos, não só os permitidos, mas também os não permitidos, como é o caso da maioria dos organoclorados.

Para uma adaptação às novas exigências do mercado globalizado, esforços para a manutenção da fitossanidade e qualidade do produto é de responsabilidade, dos vários profissionais da área. E neste aspecto, a realização de análises de rotina de resíduos, em grande número, é facilitada por métodos que tenham as vantagens de rapidez, baixo custo,

praticidade e sensibilidade. Considerando o que os vários métodos propõem, o método de análise que utiliza a MEFS pode contribuir com estas ações conjuntas. Esta técnica de extração, como já mencionado, será descrita no Capítulo II a seguir.

Tabela 1: Resultados obtidos pelo projeto PARA com os alimentos analisados em 2002 e 2003.

CULTURA	IRREGULARES 2002	IRREGULARES 2003
Alface	8,6%	6,6%
Banana	6,5%	2,2%
Batata	22,2%	8,6%
Cenoura	0,0%	0,0%
Laranja	1,4%	0,0%
Maçã	4,0%	3,6%
Mamão	19,5%	37,4%
Morango	46,0%	54,4%
Tomate	26,1%	0,0%

Fonte: Brasil (2004a)

1.2 OBJETIVO

O objetivo deste capítulo é proporcionar informações que permitam um maior conhecimento sobre os agrotóxicos e principais métodos de análise.

O seu enfoque, interligado ao Capítulo II, é estabelecer a importância da análise dos agrotóxicos organoclorados Lindano, Aldrin, DDE, Dieldrin, TDE e Mirex, como poluentes orgânicos persistentes e de um método de análise que oferece as vantagens acima descritas para análises rotineiras de agrotóxicos, como é o caso da micro-extração em fase sólida (MEFS).

2 HISTÓRICO

A origem histórica dos agrotóxicos remonta a períodos pré-cristãos, quando já se fazia uso de produtos destinados ao controle de pragas.

Entre os agrotóxicos orgânicos os mais antigos são as piretrinas (séc. XVIII), substâncias que foram usadas durante muito tempo para controlar pragas de lavouras e ainda são, com muita frequência, usadas no controle de insetos domésticos. Elas compõem a maioria dos inseticidas aerossóis que se encontram nos supermercados, na forma de ésteres do ácido crisantêmico ou do ácido pirétrico com os ceto-álcoois piretrolona ou cinerolona. (LOOSLI, 1994).

Vale lembrar que nem sempre os agrotóxicos foram usados como agente regulador de pragas, pois no final da década de 30 foram sintetizados na Alemanha com a finalidade de serem utilizados como arma química de guerra.

Após a 2ª Guerra Mundial, sobretudo a partir dos anos 50, os agrotóxicos passaram a ser utilizados no combate de pragas nas lavouras expandindo-se enormemente a partir de então, para uma produção industrial mundial de dois milhões de toneladas de agrotóxicos por ano (OPAS/OMS, 1996).

Na Guerra do Vietnã, ocorrida entre os anos de 1954 e 1975, o chamado "agente laranja" – uma mistura dos herbicidas desfolhantes: ácido 2,4,5 T (ácido 2,4,5 triclorofenoxiacético) e ácido 2, 4 D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) – foi jogado pelos Estados Unidos sobre extensas áreas de florestas do Vietnã, visando matar as árvores das florestas onde se escondiam os inimigos *vietcongs*. Esta operação militar trouxe consequências ambientais e de saúde catastróficas para a população local, como contaminações do meio ambiente, intoxicação, câncer e teratogenia e até morte (HISTÓRIA, 2003).

Há poucos anos atrás (1995), o gás Sarin foi usado como arma para cometer um dos mais graves atentados da história, matando várias pessoas e contaminando outras em um metrô de Tóquio. Sarin é um composto orgânico do tipo organofosforado, que possui a fórmula molecular $C_4H_{10}FO_2P$. É altamente tóxico, usado desde a 2ª Guerra Mundial tanto em sua forma líquida como na forma gasosa, que age de maneira rápida no sistema nervoso central (GÁS, 2004).

Na **Tabela 2** é descrito um breve cronograma relacionado ao surgimento e ao uso de alguns dos principais agrotóxicos, antes da 2ª guerra mundial, é descrito (HISTÓRIA, 2003 ; YOKOMIZO *et al.*, 1985):

No Brasil, no início dos anos 50, a introdução de inseticidas fosforados veio acompanhada de um método de homogeneização de consequência fatal: o agricultor deveria usar o braço, com a mão aberta, em forma de pá, girando meia volta, em um e em outro sentido, para facilitar a mistura do Parathion, primeiro fosforado introduzido no

Brasil, tal como foi ensinado, anteriormente, para misturar o DDT. Só que ao imitar esta prática, com o organofosforado, o agricultor morria em poucos dias ou horas. Fato que se repetiu em diversas regiões do país. Já com o DDT, por possuir uma dose letal maior, esta mesma operação levava a problemas de saúde e morte após 15 anos de contato (HISTÓRIA, 2003).

Em 1975, o Plano Nacional de Desenvolvimento (PND), responsável pela abertura do Brasil ao comércio de agrotóxicos, condicionou o agricultor a comprar o veneno com recursos do crédito rural, instituindo a inclusão de uma cota definida de agrotóxico para cada financiamento requerido. Essa obrigatoriedade – somada à propaganda dos fabricantes – determinou um enorme aumento e disseminação da utilização dos agrotóxicos no Brasil, resultando em inúmeros problemas, tanto de saúde da população como do meio ambiente. Além disso, muitos desses produtos não possuem antídotos e são proibidos em seus países de origem. (TRAPÉ, 1993).

Tabela 2 Cronograma sobre o surgimento e uso dos principais agrotóxicos, até a 2ª Guerra Mundial

PRINCIPAIS DATAS, RELACIONADAS ÀS DESCOBERTAS E USOS DE
AGROTÓXICOS

1000 A.C. – O enxofre elementar, extraído de rochas, já era usado como pesticida no controle de diversas pragas. Ainda hoje, este produto é usado em forma de uma solução feita, domesticamente, chamada calda sulfo-cálcica. Considerada de baixo impacto, é muito segura para aplicar sobre plantas alimentares ou ornamentais de jardins e interiores.

1637 – O sal de cozinha foi usado para controlar o "carvão" do milho que é uma doença que atacava as espigas deixando-as totalmente tomadas por uma massa de fungos negros.

1705 – O cloreto de arsênio e de mercúrio eram recomendados para o "carvão" do milho.

1761 – O sulfato de cobre foi muito usado, também, para tratamento de "carvão" do milho.

1825 - O BHC foi sintetizado, mas nada se sabia sobre seu poder inseticida.

1867 – O acetoarsenito de cobre foi preparado comercialmente e, a seguir, vários produtos de origem vegetal, como a nicotina, estricnina, piretros, etc e inorgânicos como arsênio, flúor, antimônio, bário, boro, chumbo, cádmio e mercúrio foram utilizados no combate às pragas.

1874 – O cientista alemão O. Zeidler sintetizou o DDT, sem ter conhecido o seu poder como inseticida.

1886 – O cientista Pierre Aléxis na França descobriram a calda-bordalesa, tendo como principal componente o sulfato de cobre. A calda bordalesa é ainda hoje muito usada, sendo um agrotóxico de baixo impacto ao meio ambiente e toxicidade ao homem, bem aceito pelas correntes de agricultura orgânica.

Fonte: História (2003) ; Yokomizo *et al.* (1985):

O Brasil encontra-se, atualmente, entre os principais consumidores mundiais de agrotóxicos (SINDAG, 2004).

A maior utilização de pesticidas é na agricultura, especialmente nos sistemas de monocultura, em grandes extensões. São também utilizados em saúde pública, na eliminação e controle de vetores transmissores de doenças endêmicas. E, ainda, no tratamento de madeira para construção, no armazenamento de grãos e sementes, na produção de flores para o combate a piolhos e outros parasitas, na pecuária e etc (OPAS/OMS, 1996).

Na **Tabela 3** é um breve resumo apresentado sobre a evolução do uso dos agrotóxicos a partir da 2ª Guerra Mundial (HISTÓRIA, 2003; YOKOMIZO, *et al.*, 1985).

Os novos produtos, entre eles os fisiológicos atuam não mais envenenando o inseto através de intoxicação do sistema nervoso, mas impedindo que se forme a chamada ecdise, ou troca de pele mais comum entre as lagartas (TRAPÉ, 1993).

Surgem também os transgênicos, plantas inoculadas com seqüências de genes de outros seres como bactérias e vírus, tornando as plantas resistentes às pragas (TRAPÉ, 1993; HISTÓRIA, 2003).

Intensifica-se um pouco mais o uso dos feromônios. Eles são substâncias que imitam o "cheiro" dos insetos transmitindo a eles informações falsas que possibilitam sua atração e captura, ou induzem o medo e a fuga, ou mesmo atrapalham o processo de atração sexual (HISTÓRIA, 2003).

3 DEFINIÇÃO DOS AGROTÓXICOS

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2004) define os agrotóxicos como substâncias ou misturas de substâncias, de natureza química, destinadas a prevenir, destruir ou a repelir, direta ou indiretamente qualquer forma de agente patogênico, animal ou vegetal, nocivo às plantas aos animais ou aos seus produtos e subprodutos e ao homem. Sendo considerados produtos afins os hormônios reguladores de crescimento e produtos químicos e bioquímicos de uso veterinário.

O Artigo 2º da Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989 (BRASIL, 1989) define que

agrotóxicos e afins são os produtos e os 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 implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-los da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.

Essa definição exclui fertilizantes e produtos químicos administrados a animais para estimular crescimento ou modificar comportamento reprodutivo.

Tabela 3 Cronograma sobre o surgimento e uso dos principais agrotóxicos, após a 2ª Guerra Mundial

PRINCIPAIS DATAS RELACIONADAS ÀS DESCOBERTAS E USOS DE AGROTÓXICOS

1932 – O cientista alemão Gerard Schrader sintetizou gases fosforados que atuam no sistema nervoso utilizados como armas da 2ª Guerra Mundial. Gases como Sarin vieram mais tarde a ter seu princípio ativo na forma líquida para uso com inseticida e no combate a outras pragas agrícolas.

1939 – O cientista Paul Muller descobriu as propriedades inseticidas do DDT, a partir de pesquisa sobre o desenvolvimento de um produto que pudesse repelir traças, feitas na CIA Geigy, na Basiléia, Suíça.

1941 – Pesquisadores franceses e ingleses descobriram as propriedades inseticidas dos BHC's

1947 – Os ingleses começaram a dar o primeiro passo na descoberta dos carbamatos através do estudo da planta *Physostigma venenosum*, nativa da África, verificando que ela produzia um ácido extremamente tóxico, que, como os inseticidas fosforados, atacavam o sistema nervoso.

Final da década de 40 – Os alemães introduziram os inseticidas organofosforados e o cientista Paul Muller recebeu o Prêmio Nobel de medicina (o DDT possibilitou o combate de uma enormidade de vetores de doenças, bem como de pragas que atacavam as lavouras e os animais).

1956 – Os carbamatos foram efetivamente introduzidos para uso como agrotóxico.

Década de 80 – O mercúrio ainda era usado no Brasil como componente de alguns agrotóxicos, mas hoje seu uso é proibido. Esse metal pesado se transloca nas cadeias tróficas e chega finalmente no homem onde causa sérios problemas de saúde, afetando o sistema nervoso principalmente.

Década de 90 – O DDT foi banido de muitos países, inclusive do Brasil porque, apesar de ser um inseticida pouco tóxico, ele possui altíssima capacidade de bioacumulação, isto é, fica retido nos tecidos dos seres vivos por muitos anos Além disso, ele se desloca para regiões longínquas daquelas onde foi aplicado. Traços de DDT foram encontrados em gordura de esquimós e pingüins vivendo a 5.000 km dos locais de uso.

O desfolhante ácido 2,4,5 Triclorofenoxiacético (2,4,5 T) foi proibido no Brasil em função de uma impureza que era produzida durante o processo de fabricação, a dioxina. Esta é uma das substâncias mais tóxicas já sintetizadas pelo homem, além de apresentar efeitos teratogênicos. Entretanto, os processos atuais reduziram os níveis de dioxina no 2,4,5 T em 80 vezes, continuando mesmo assim, ainda proibido no Brasil. O 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4 D), entretanto, ainda é amplamente usado para controle de ervas daninhas em pastagens.

Fonte: História (2003) ; Yokomizo *et al* (1985)

Uma das mais completas definições para os agrotóxicos é, sem dúvida, a da Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas, que define um agrotóxico como sendo:

qualquer substância ou mistura de substâncias utilizadas com o objetivo de prevenir, destruir ou controlar qualquer praga, incluindo vetores de doenças animais ou humanas, espécies indesejáveis de plantas ou animais que causem dano ou que, de alguma forma interfiram durante a produção, processamento, estocagem, transporte ou comercialização de alimentos, produtos relacionados a agricultura, madeira e seus derivados, rações ou ainda substâncias que possam ser administradas em animais para o controle de insetos, aracnídeos ou outras pragas dentro ou sobre seus corpos. O termo inclui ainda substâncias utilizadas como reguladores do crescimento de plantas, desfolhantes, dessecadores, ou ainda agentes para prevenir a queda prematura de frutas e substâncias aplicadas a plantação, antes ou depois da colheita, para prevenir a deterioração durante a estocagem ou o transporte" (TORQUILHO, 2001).

De acordo com o Manual de Vigilância de Populações Expostas a Agrotóxicos (OPAS/OMS, 1996), o termo “agrotóxico” passou a substituir o termo “defensivo agrícola”, no Brasil, para denominar os venenos agrícolas, após grande mobilização da sociedade civil organizada.

Mais do que uma simples mudança da terminologia, esse termo coloca em evidência a toxicidade destes produtos para o meio ambiente e para a saúde humana. São ainda genericamente denominados de praguicidas ou pesticidas (OPAS/OMS, 1996).

4 CLASSIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS

Dada a sua grande diversidade, cerca de 300 princípios ativos em 2 mil formulações comerciais diferentes, abrangendo uma enorme variedade de funções químicas, os agrotóxicos foram inicialmente divididos em Inorgânicos e Orgânicos (YOKOMIZO *et al*, 1985), muitas vezes considerando a sua origem (mineral, vegetal, microbiano) e a ordem cronológica de surgimento. Mas a classificação, geralmente, é feita considerando o seu modo de ação, toxicidade, finalidade e o grupo químico a qual pertencem.

4.1 CLASSIFICAÇÃO QUANTO AO MODO DE AÇÃO

De acordo com o mecanismo de ação, destacam-se os agrotóxicos de Contato (atuam no inseto por meio do contato com alguma parte de seu corpo); Estomacais (atuam no inseto através da ingestão); Sistêmicos (localizam-se dentro do sistema vascular da planta, atuando no inseto através da ingestão) e Fumigantes (atuam no inseto ao penetrar o seu aparelho respiratório) (YOKOMIZO *et al*, 1985).

4.2 CLASSIFICAÇÃO QUANTO À FINALIDADE

Na **Tabela 4**, encontram-se os principais grupos de agrotóxicos classificados quanto à finalidade. O Ministério da Agricultura, através do Programa Agrofit (BRASIL,1997), declarou o número de produtos registrados (N) para cada classe de ação.

Tabela 4: Grupos de agrotóxicos quanto ao destino específico.

CLASSIFICAÇÃO	N ^(a)	FINALIDADE	EXEMPLOS
Inseticida ^(b)	597	Insetos	Malation, <i>Bacillus thurigiensis</i>
Fungicida	343	Fungos	Merpan, Mancozeb
Acaricidas	259	Ácaros	Ethion,
Herbicidas	655	Ervas daninhas	Round-up
Bactericida	19	Bactérias	Amoxicilin
Molusquicidas	4	Moluscos	Metaldeído

(a) N = números de produtos registrados

(b) Incluindo os inseticidas biológicos (N = 11) e os feromônios (N=5)

Fonte: Brasil (1997).

4.3 CLASSIFICAÇÃO QUANTO À TOXICIDADE

Por volta de 27 anos atrás, os agrotóxicos, embora se tratando de espécies tóxicas, não possuíam nenhuma forma de identificação de sua periculosidade, sendo comercializados livres de qualquer legislação específica. Porém, a partir de 1977, o Ministério da Agricultura promulgou a Portaria nº 749, visando a padronização da rotulagem de tais produtos com a finalidade de facilitar o uso seguro e adequado pelo agricultor, melhor proteger a saúde pública, estabelecer as precauções de uso para cada tipo de produto e facilitar a classificação e a visualização dos produtos conforme o seu grau de toxicidade. Baseados na dose letal de 50% (DL₅₀) e intoxicação aguda para ratos brancos, dos ingredientes ativos e de suas formulações, bem como, considerando a gravidade de risco para o homem, agrupou-se tais produtos em quatro classes toxicológicas, nomeando e identificando por faixa de diferentes cores, localizadas na parte inferior do rótulo (LIMA & RACCA-FILHO, 1987).

Na **Tabela 5** estão as classes toxicológicas relacionadas com a dose letal 50 (DL₅₀), e com a quantidade suficiente para matar uma pessoa adulta (LIMA & RACCA-FILHO, 1987; TRAPÉ, 1993).

A classificação do agrotóxico segundo o seu poder tóxico é fundamental para o conhecimento de seus efeitos agudos, diagnóstico das intoxicações e instituição de tratamento específico. Esta classificação é de grande importância também para normas que regulamentam a rotulagem, comercialização e aplicação desses produtos.

Tabela 5 Classificação dos agrotóxicos quanto à toxicidade

GRUPOS	CASSE	COR DA FAIXA ^(A)	DL ₅₀ (mg/kg)	DOSE INDIVIDUAL ^(B)
Altamente tóxicos	I	Vermelho Intenso	= 50	Até uma colher de chá
Medianamente tóxicos	II	Amarelo intenso	50 – 500	Uma colher de chá – duas colheres de sopa
Pouco tóxicos	III	Azul intenso	500 – 5.000	Dois colheres de sopa – um copo
Muito pouco tóxicos	IV	Verde intenso	> 5.000	Um copo – um litro

(A) Faixa que vem impressa no rótulo

(B) Dose capaz de matar uma pessoa adulta de 60 kg.

Fonte: Lima & Racca-Filho (1987).

4.4 CLASSIFICAÇÃO QUANTO À FUNÇÃO QUÍMICA

Os grupos químicos de agrotóxicos mais importantes são: organofosforados, organoclorados, piretróides e carbamatos.

Organofosforados: são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, do ácido tiofosfórico ou do ácido ditiofosfórico (YOKOMIZO *et al.*, 1985; RICKET *et al.*, 1986). São altamente tóxicos, agindo no sistema nervoso central levando à morte por insuficiência respiratória (RICKET *et al.*, 1986).

Por serem muito reativos, os organofosforados possuem pouca persistência no ambiente, sendo bastante usados na agricultura em substituição aos organoclorados (YOKOMIZO *et al.*, 1985). Mas, o pouco que se sabe sobre os seus produtos de degradação é que parecem exercer tanto ou mais efeito tóxico do que o seu precursor. Exemplos.: Folidol, Azodrin, Malation, Diazinon, Nuvacron, Tantonon, Rhodiatox.

Organoclorados: são compostos à base de carbono, com radicais de cloro. Foram muito utilizados na agricultura, como inseticidas, porém seu emprego tem sido

progressivamente restringido, ou mesmo proibido. São substâncias bioacumulativas, estáveis, com baixa solubilidade em água e alta lipossolubilidade (WALKER *et al.*, 1996).

Devido a estas características, este grupo degrada-se com muita lentidão, acumulando-se no meio ambiente, em plânctons e larvas, nos tecidos adiposos dos peixes, das aves e por fim dos mamíferos, o topo desta cadeia alimentar, ganhando destaque, pois nestes parecem ocorrer as maiores quantidades de resíduos. Exemplos: Aldrin, Endrin, Endossulfan, Heptacloro, Lindano, Mirex (YOKOMIZO *et al.*, 1985).

Carbamatos: são derivados do ácido carbâmico. São considerados bastantes tóxicos para os mamíferos, inibindo a acetilcolinesterase de maneira reversível (LOOSLI, 1994). Exemplos: Carbaril, Tentfk, Zeclram, Furadan (LIMA & RACCA-FILHO, 1987).

Piretróides: são compostos sintéticos que apresentam estruturas semelhantes à piretrina, substância existente nas flores do *Chrysanthmum* (pyrethrum) cinenariaefolium. Alguns desses compostos são: aletrina, resmetrina, decametrina, cipermetrina (TORQUILHO, 2001).

Outros grupos importantes compreendem:

- Paraquat: comercializado com o nome de Gramoxone.
- Glifosato: é um herbicida comercializado comumente com o nome de Round-up.
- Pentaclorofenóis.
- Derivados do ácido fenoxiacético: ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) a ácido 2,4,5 triclorofenoxiacético (2,4,5 T). A mistura de 2,4 D com 2,4,5 T representa o principal componente do agente laranja, utilizado como desfolhante na Guerra do Vietnã. O nome comercial dessa mistura é Tordon.
- Dinitrofenóis: comercializado com o nome de Dinoseb.

4.5 CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM A ÉPOCA DE SURGIMENTO

Segundo Toledo e colaboradores (1997), os agrotóxicos podem ainda ser divididas em grupos de acordo com a ordem cronológica de surgimento (**Tabela 6**).

Tabela 6 Classificação cronológica dos agrotóxicos.

CLASSIFICAÇÃO	AGROTÓXICOS
Primeira geração	Inorgânicos: Enxofre, Arsênio, Fluoretos. Orgânicos vegetais: Nicotina, Piretrinas naturais, Rotenona. Orgânicos minerais: Óleos minerais.
Segunda geração (São todos orgânicos sintéticos)	Clorados (HCH, DDT, Heptaclor, etc.); Fosforados (Malation, Paration, Monocrotofós, etc.) Carbamatos (Carbaril, Carbofuran, etc.) Piretróides (Deltametrina, Permetrina, Cipermetrina, etc.)
Terceira geração	Microbianos e Feromônios
Quarta geração	Hormônios juvenis (Diflubenzuron, Metroprene, etc.)
Quinta geração	Anti-hormônios; Microorganismos (Avermectin)

Fonte: Toledo *et al.* (1997).

5 FORMAS DE USO

A forma mais freqüente de aplicação dos agrotóxicos é através de pulverizações sobre as culturas ou no solo, realizadas com o auxílio de equipamentos manuais, automotores, tratorizados, e em menor grau, por aviões. Esta última forma de aplicação é a que mais causa intoxicações ou contaminação ambiental, porque é extremamente ineficiente. Os equipamentos, à distância, produzem uma nuvem de gotículas pequenas sobre a cultura, que em sua maioria não consegue atingir o alvo biológico (doença, inseto ou erva daninha) a ser controlado, chegando apenas uma minoria do veneno aplicado até ele (MACHADO-NETO, 1990; YOKOMIZO *et al.*, 1985).

6 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

6.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Como já mencionado anteriormente, na década de 70, o governo brasileiro incentivou a disseminação e a utilização de agrotóxicos na agricultura, passando o País a vivenciar a necessidade de controlar cada vez mais os efeitos à saúde decorrentes dessa utilização.

Cerca de 70% dos pesticidas produzidos por ano são consumidos em países considerados desenvolvidos. No entanto, a maior quantidade de mortes decorrentes da exposição humana a esses agentes é observada nos países em desenvolvimento (JEYARATMAN, 1990).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1990, estimou a ocorrência mundial de cerca de três milhões de intoxicações agudas por agrotóxicos, com 220.000 mortes por ano. Dessas, cerca de 70% ocorreriam em países do chamado Terceiro Mundo (JEYARATMAN, 1990).

As intoxicações agudas de aplicadores de pesticidas no Brasil foram intensificadas e, segundo Rüegg e colaboradores (1991), estima-se a ocorrência de um caso de intoxicação aguda em cada 8 trabalhadores agrícolas examinados.

Em 1993, de acordo com o Sistema Nacional de Informação Tóxico-Farmacológica (SNITF) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, 1993) ocorreram no Brasil 6.193 casos de intoxicação por pesticidas agrícolas, domésticos e raticidas. Segundo o SNITF, os dados que refletem a realidade do número de intoxicações e mortes por agrotóxicos costumam ser imprecisos, subestimados, porém, é fácil supor que o tamanho do problema não é pequeno, pois somos um dos maiores consumidores mundiais, e, muitas vezes, requisitos básicos de segurança para a aplicação, armazenamento e disposição final dos mesmos não são cumpridos.

Em Santa Catarina, um levantamento efetuado, no período 1986-1990, mostrou que 47% dos 7.597 produtores rurais já haviam tido algum tipo de intoxicação. Análises de sangue feitas em 6.635 deles mostraram que 18% apresentavam um nível de atividade de colinesterase em 75% (limite mínimo crítico) e 5,7% apresentavam abaixo desse nível, já necessitando de cuidados médicos (BRASIL, 1990).

No município de Apiaí (Santa Catarina), produtor tradicional de tomates, o número de intoxicações durante as aplicações é um dos mais altos. Crianças e adultos pulverizam produtos tóxicos nas proximidades das residências e leitos de rios e não sabem o que fazer com as embalagens. Cerca de 47% dos agricultores desconhecem as informações sobre período de carência, mesmo fazendo parte do Programa Nacional de Fortalecimento a Agricultura Familiar – PRONAF (CORDEIRO *et al.*, 1996).

Em 1993 a Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, constatou no país a ocorrência de seis mil casos de intoxicações por agrotóxicos. Considerando a projeção da Organização Mundial de Saúde, de que para cada caso notificado ocorrem outros cinquenta sem serem notificados, esta Fundação estima que em 1993 ocorreram aproximadamente 300 mil intoxicações no Brasil (CORDEIRO *et al.*, 1996).

Estima-se, ainda, que cerca de 2% da população brasileira são contaminadas anualmente por pesticidas e que, para cada caso constatado em hospitais e ambulatórios, deve haver, aproximadamente, 250 vítimas não registradas, principalmente pela falta de conhecimentos dos médicos em toxicologia (GARCIA, 1996).

Além da intoxicação dos trabalhadores, que têm contato direto ou indireto com esses produtos, a contaminação de alimentos tem levado a um grande número de intoxicações e mortes (TRAPÉ, 1993).

Entre os grupos profissionais que têm contato com os pesticidas, destacam-se os trabalhadores: do setor agropecuário, de saúde pública, de firmas desinsetizadoras, dos setores de transporte e comércio, das indústrias de formulação e síntese (TRAPÉ, 1993).

As pessoas que têm contato direto com os praguicidas, na fabricação e na aplicação dos mesmos, podem correr riscos de intoxicação que, dependendo do produto e dos cuidados seguidos, podem, muitas vezes, ser fatais. Nos alimentos, esses compostos podem vir de uma aplicação direta em uma das fases da produção, do transporte, ou do armazenamento (ANDRADE, 1995; DIHAM, 1993; MACHADO NETO, 1990).

Alguns estudos realizados em vários estados do Brasil detectaram, por exemplo, a presença de agrotóxicos organoclorados no leite materno, e também apontaram a possibilidade de ocorrência de anomalias congênitas relacionadas ao uso de agrotóxicos. Isto demonstra que os problemas de saúde decorrentes desses venenos não se restringem ao trabalhador rural, mas também à população geral, constituindo-se, portanto, num grave problema de saúde pública, demandando a intervenção de organizações internacionais em diversas esferas, como a implantação do sistema de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos (FIOCRUZ, 1993; OPAS/OMS, 1996).

No campo observa-se, ainda, que o descarte das embalagens vazias de praguicidas, ainda hoje praticados pela maioria dos produtores rurais, constitui séria ameaça ao meio ambiente. Esse lixo é constituído por material de difícil decomposição, principalmente quando submerso o que explica o seu acúmulo no meio ambiente durante tantos anos (BULL, 1986).

6.2 ALGUNS TERMOS RELACIONADOS À TOXICIDADE E AO EMPREGO DE AGROTÓXICOS

A seguir são apresentadas algumas definições relacionadas à toxicidade e ao uso de pesticidas, que são comumente utilizadas nesta área (BRASIL, 2004b):

Resíduos de Agrotóxicos: são todas as substâncias nos alimentos humanos ou animais, resultantes do emprego de pesticidas, incluindo-se todos os derivados, tais como: produtos de degradação e de conversão, metabólitos e produtos de reação que são considerados de significância toxicológica.

Ingestão diária (IDi): representa a quantidade do agrotóxico ingerida diariamente por um ser humano adulto (60 kg), admitindo-se o quanto o mesmo consome do alimento por dia e o teor residual persistente neste alimento. Através de inquérito alimentar, aplicado na população da região ou do país, sabe-se sobre a quantidade que se consome diariamente de cada alimento ou grupo de alimentos. Com os dados gerados e tratados estatisticamente

têm-se valores que representam o consumo alimentar da maioria da população. A determinação do teor residual persistente no alimento em questão, após tratamento com o agrotóxico de interesse (obedecendo à boa prática agrícola), tem que ser realizada por ocasião do seu consumo.

Ingestão diária aceitável (IDA): a IDA representa a quantidade do agrotóxico que pode ser ingerida diariamente sem riscos apreciáveis à saúde, considerando o conjunto de dados toxicológicos conhecidos. É expressa em mg do agrotóxico por kg de peso corpóreo (mg/kg p.c.).

Limite máximo de resíduos (LMR): o LMR ou a tolerância de um agrotóxico é a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico ou afim, oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde a sua produção até o consumo, expressa em partes (peso) do agrotóxico, afim ou seus resíduos, por milhão de partes de alimento em peso (ppm ou mg/kg). Em termos de segurança alimentar nacional a LMR é estabelecida por órgãos públicos oficiais.

O LMR é estabelecido para cada alimento, e, para o seu cálculo, segundo a FAO/OMS compara-se a IDi com a IDA. Se a IDi < IDA, admite-se o valor do teor de resíduo que persiste no alimento como o LMR. Caso IDi > IDA o agrotóxico pesquisado não poderá ser registrado para uso na cultura em questão.

Prazo de Carência: é o intervalo de tempo, expresso em dias, entre a última aplicação do defensivo e a colheita ou comercialização do vegetal, abate ou ordenha do animal, conforme o caso, a fim de que os resíduos estejam de acordo com o LMR. Este período é extremamente importante para a redução ou eliminação dos depósitos ou resíduos dos agrotóxicos na cultura.

6.3 EFEITOS TÓXICOS DOS AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS

Os agrotóxicos organoclorados são produtos sintéticos, pouco solúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, o que os torna mais tóxicos e de apreciável absorção cutânea (YOKOMIZO *et al.*, 1985).

Devido à grande lipossolubilidade e à lenta metabolização, esses compostos acumulam-se na cadeia alimentar e no tecido adiposo, em equilíbrio dinâmico com a absorção. A eliminação se faz pela urina, cabendo destacar também a eliminação pelo leite materno (YOKOMIZO *et al.*, 1985).

Além da via dérmica, são também absorvidos por via digestiva e respiratória. São estimulantes do sistema nervoso central (em altas doses são indutores das enzimas microsômicas hepáticas), resultando em alterações do comportamento, distúrbios sensoriais, do equilíbrio, da atividade da musculatura involuntária e depressão dos centros vitais, particularmente da respiração (OPAS/OMS, 1996).

Em casos de intoxicação aguda, após duas horas aparecem sintomas neurológicos de inibição, hiper-excitabilidade, parestesia na língua, nos lábios e nos membros inferiores, desassossego, desorientação, fotofobia, escotomas, cefaléia persistente (que não cede aos analgésicos comuns), fraqueza, vertigem, alterações do equilíbrio, tremores, ataxia, convulsões tônico-crônicas, depressão central severa, coma e morte.

Em casos de inalação ou absorção respiratória, podem ocorrer sintomas específicos, como tosse, rouquidão, edema pulmonar, irritação laringotraqueal, rinorréia, broncopneumonia (complicação freqüente), bradipnéia e hipertensão. Logo após a ingestão, náuseas e vômitos são sintomas proeminentes, podendo ocorrer também diarréia e cólica (OPAS/OMS, 1996).

7 ASPECTOS DA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

A Legislação Federal - lei 7.802 de 1989 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1989) obriga, em tese, que um agrotóxico só seja comprado pelo produtor depois de emitido o receituário agrônômico, que é de competência de Engenheiros Agrônomos e de Engenheiros Florestais (BRASIL, 2004b).

Por outro lado, o receituário agrônômico não pode ser entendido apenas como uma receita escrita, mas sim como um processo em que o Engenheiro vá até a propriedade do agricultor, verifique as condições da cultura, em todo seu contexto sócio-econômico-ambiental, e, então, somente depois desta rigorosa inspeção, seja emitido ou não, uma receita agrônômica para que o agricultor compre e aplique o agrotóxico (LIMA & RACCA-FILHO, 1987).

Na receita deve conter também os equipamentos obrigatórios de proteção para a aplicação do produto, que visam proteger o trabalhador, a dosagem, o equipamento usado para aplicar o agrotóxico, bem como, o mais importante fator de proteção ao consumidor que é o chamado "Prazo de Carência" (LIMA & RACCA-FILHO, 1987).

Os agrotóxicos banidos na maioria dos países, por serem considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs) em potencial, foram organizados em doze grupos denominados "grupos dos sujos", que são: 1- Os DDTs; 2- Os Drins (Aldrin, Endrin, Dieldrin); 3- Clordano; 4- Heptacloro; 5- O BHC e Lindano; 6- Parathion; 7- Os monocrótofos (Azodrin e Nuvacron); 8- Aldicarb; 9- Clordimeform ;10- O "Agente Laranja" (2-4-3T), o EDB e o DBCP; 11- Paraquat; 12- Fungicidas à base de mercúrio (HISTÓRIA, 2003).

Os inseticidas organoclorados foram muito utilizados na agricultura, porém seu emprego tem sido progressivamente restringido ou mesmo proibido, por serem de lenta degradação, com capacidade de acumulação no meio ambiente (podem persistir até 30 anos no solo) e em seres vivos, contaminando o homem diretamente ou por intermédio da cadeia alimentar, assim como por apresentarem efeito carcinogênico em animais de laboratório. No Brasil, seu uso foi limitado pela Portaria n.º 329, de 2/9/85, que permitiu sua utilização

somente no controle de formigas (Aldrin e Mirex) e em campanhas de saúde pública (DDT e BHC) (OPAS/OMS, 1996).

8 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Em torno dos agrotóxicos se desenvolvem as mais aceras polêmicas, quando se trata da relação entre agricultura e meio ambiente.

Em primeiro lugar, os interesses em jogo são gigantescos. Os gastos mundiais em agrotóxicos são de dezenas de bilhões de dólares, sendo a América Latina a região onde mais as vendas cresceram. Só no Brasil, segundo informação do Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Agrícolas (SINDAG, 2004), o setor faturou, em 1997, quase US\$ 2,2 bilhões, atingindo, US\$ 200 milhões a mais que no ano anterior.

A hipótese de utilização em larga escala de produtos transgênicos oferece uma promissora e preocupante perspectiva de ampliação deste mercado, uma vez que plantas transgênicas, como o milho e a soja, por exemplo, ficam mais resistentes a herbicidas. Atuando somente nas ervas daninhas não causando danos às plantações, a tendência do uso de herbicidas, ao contrário do que se pensa, tende a aumentar (SANTOS, 2003).

Em segundo lugar, trata-se da avaliação dos riscos que a utilização dos agrotóxicos envolve. Menores gastos de agrotóxicos não significam necessariamente redução dos efeitos indesejáveis ao meio ambiente, como bem apregoam (YUDELMAN *et al*, 1998).

Yudelman e colaboradores (1998) mencionam que "nos últimos cinquenta anos a indústria de pesticidas procurou desenvolver pesticidas menos tóxicos e mais seletivos em seus alvos, requerendo menores doses por hectares e com menor persistência no ambiente". Os produtos correspondentes àquilo que os especialistas chamam de segunda geração de agrotóxicos, como o DDT, o BHC e o Parathion, reduziram em muito a dosagem de aplicação por hectare nos países desenvolvidos (de 1966 a 1987). Entretanto, a toxicidade destes pesticidas cresceu ao menos dez vezes desde o final da Segunda Guerra Mundial.

Os ambientalistas, bem como os governos de diversos países do Hemisfério Norte, como Suécia, Dinamarca e Holanda, procuram valorizar sistemas de utilização do solo que reduzam significativamente a própria necessidade de se aplicarem pesticidas. Segundo Yudelman e colaboradores (1998), isto é uma tarefa difícil, uma vez que o número de insetos resistentes vem crescendo desde 1938, quando somente sete insetos eram conhecidos por sua resistência a pesticidas. Em 1984 este montante elevou-se para 477. Não se conheciam ervas daninhas resistentes a agrotóxicos antes dos anos 1970 e elas chegaram a 48 no final do ano de 1980.

Ao fornecerem estas informações, Yudelman e colaboradores (1998) alertam que a resistência das pragas aos agrotóxicos cresce mais rapidamente no clima tropical que no temperado. Este efeito se manifesta tanto mais rapidamente quanto mais intensa for a especialização cultural, e com o conseqüente uso de agrotóxicos como forma de combater

as pragas nas lavouras e nos pastos. Então, a melhor informação que se tem sobre o uso de agrotóxicos no Brasil é na região Sul, onde mais da metade da área de lavouras de verão no Paraná e no Rio Grande do Sul é ocupada por uma só cultura, a soja – embora a soja tenha se espalhado por outros estados brasileiros (nas regiões de Cerrado do Centro Oeste, da Bahia e do Maranhão).

É na soja que se concentra a maior parte dos gastos com a agricultura brasileira, seguida pelos gastos com a cana-de-açúcar, mas a concentração de seus 330 mil ha cultivados nas usinas do Norte do Paraná (apenas 6,7% do total nacional) constitui a raiz de vários problemas de contaminação de águas constatados até hoje. O milho, terceiro produto na lista dos que mais consomem agrotóxicos, tem cerca de um terço de sua área total no Sul do País. Outros produtos que aparecem com destaque na lista de uso de agrotóxicos são: o arroz irrigado e a batata inglesa que vem basicamente do Sul (SINDAG, 2004).

Da mesma forma que na Europa Ocidental e nos Estados Unidos, é em herbicidas (na soja, cana-de-açúcar e milho) que os agricultores brasileiros mais gastam, quando se trata de agrotóxicos, seguido dos inseticidas (na soja, café, algodão e nas sementes) e em terceiro em fungicidas (no café, batata inglesa, trigo e nas frutas) (SINDAG, 2004).

O que chama a atenção nestas informações, embora os especialistas sejam unânimes na constatação de técnicas alternativas ao uso de pesticidas, é que o consumo de defensivos não cessa de aumentar. Na área de grãos, esta elevação explica-se em parte pela própria generalização do plantio direto, que é um importante método de combate à erosão, mas cuja forma dominante torna hoje os agricultores cada vez mais dependentes da aplicação de herbicidas. (SINDAG, 2004).

9 INSETICIDAS ORGANOCLORADOS

No grupo dos agrotóxicos orgnoclorados estão incluídos os mais importantes inseticidas, tais como DDT, Aldrin, BHC, Declorano, etc. Os compostos que pertencem a esse grupo geralmente são caracterizados por apresentar (YOKOMIZO *et al.*, 1985; LIMA & RACCA-FILHO, 1987):

- 1) Presença de átomos de carbono, cloro, hidrogênio e, algumas vezes, oxigênio, ou enxofre incluindo um número variável de ligações C-Cl ;
- 2) Presença de cadeias cíclicas (aromáticas ou não);
- 3) Apolaridade e lipossolubilidade;
- 4) Estabilidade ao meio ambiente.

Os organoclorados são pouco solúveis em água, estáveis à luz solar, à umidade, ao ar e ao calor, tornando-os bastantes persistentes no meio ambiente. Como consequência disto, muitos países permitem o seu uso exclusivamente em campanhas de saúde pública, para combater insetos vetores de enfermidades de importância epidemiológica, como por

exemplo, a malária e a dengue. Outros países têm seu uso proibido ou restrito (YOKOMIZO *et al.*,1985).

Resíduos de inseticidas organoclorados, apesar de uso restrito ou proibido, ainda são detectados com muita frequência em amostras ambientais (DUGAY *et al.*,1998; FIDALGO *et al.*,2003).

Em países onde se tem utilizado estes compostos é mais frequente encontrar resíduos em alimentos por serem de difícil degradação.

No geral, são considerados três principais grupos de inseticidas clorados: DDT e análogos; BHCs e ciclodienos (YOKOMIZO *et al.*,1985).

9.1 GRUPO DO DDT E ANÁLOGOS:

O grupo do DDT e análogos é também denominado de difenil alifáticos (FIDALGO *et al.*,2003).

O DDT é um inseticida dos mais conhecidos, sendo considerado de largo espectro de ação, e é também um dos sintéticos mais baratos. Foi primeiramente sintetizado em 1874 pelo químico austríaco Zeidler, porém, suas propriedades inseticidas permaneceram ocultas até 1939, quando Paul Muller as descobriu. Muller procurava sintetizar um repelente para traças de roupa, trabalhando na Cia. Geigy, Basileia, Suíça, em tratamento de tecidos. Posteriormente, estudando compostos relacionados aos repelentes, ele sintetizou o DDT que se mostrou um inseticida extraordinário (YOKOMIZO *et al.*, 1985).

A descoberta do DDT como inseticida também estimulou a procura de novos compostos sintéticos que pudesse apresentar resultados comparáveis. Assim, após 1939, iniciou-se a fase do aparecimento dos inseticidas organossintéticos modernos. Entretanto, poucos puderam competir em eficiência e baixo custo com o DDT (YOKOMIZO *et al.*, 1985).

Atualmente todos, e principalmente o DDT, dada a sua persistência, têm sido responsabilizados como grandes poluidores do meio ambiente e causadores de infertilidade de animais e de proporcionar desequilíbrio nas balanças biológicas da natureza. Isto, e ainda o aparecimento de muitas espécies de insetos resistentes, causaram proibição do DDT. A legislação brasileira permite o uso do DDT, atualmente, somente no emprego em campanhas antimaláricas (YOKOMIZO *et al.*,1985).

Os análogos do DDT sintetizados que foram moderadamente empregados como inseticidas são:

- 1) TDE: 2,2-bis (p-clorofenil)-1,1-dicloroetano ou tetracloro-difenil-etano ou DDD dicloro-difenil-dicloroetano,
- 2) DDE: dicloro-difenil-dicloroetano, ou 2,2-bis (p-clorofenil)-1,1 dicloroetano
- 3) Metoxicloro: 2,2-bis (p-metoxifenil)-1,1,1-tricloroetano.
- 4) Dicofol: 2,2-bis (p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetanol
- 5) Clorobenzilato: etil p-p'-diclorobenzilato
- 6) Perthane: 2,2-bis (p-etilfenil)-1,1,1-tricloroetano

Na **Figura 1** tem-se representado a estrutura de alguns destes.

O TDE (DDD) é menos tóxico para os mamíferos que o DDT, mas é mais eficiente contra as larvas de algumas espécies de mosquito. O TDE além de ser uma substância sintetizada para fins inseticidas, também é produzido naturalmente via metabolismo do DDT. Seu acúmulo no córtex adrenal de alguns mamíferos resulta em atrofiamento deste órgão. O DDA ácido dicloro difenil-acético (**Figura 1**) é também um metabólito do DDT, mas não tem atividade inseticida (YOKOMIZO *et al.*,1985).

O metabolismo do DDT, dependendo do organismo, pode ocorrer por uma das três vias abaixo, levando a um dos cinco metabólitos (YOKOMIZO *et al.*,1985).

- (1) Oxidação do radical (CHCCl_3) do DDT, levando ao (CHCOOH) do DDA; ou ao a (COHCCl_3) do Dicofol, ou ao (C=O) da Diclorobenzofenona.
- (2) Redução do radical (CHCCl_3) do DDT, por desidrocloração, levando ao (C=CCl_3), produzindo o DDE.
- (3) Redução do radical (CHCCl_3) do DDT, por substituição de um cloro pelo hidrogênio, levando a (CHCHCl_3) produzindo o TDE.

Nos mamíferos pode ocorrer o TDE, mas é o DDA o maior metabólito do DDT, sendo encontrado em fezes e urina.

O TDE foi amplamente encontrado em amostras de água, de solos, de plantas e de tecidos animais, obtidas de áreas onde o DDT, e não o TDE, havia sido pulverizado. Em 1965, ficou demonstrada a possibilidade de conversão do DDT em TDE, mesmo em águas de lagos (YOKOMIZO *et al.*,1985).

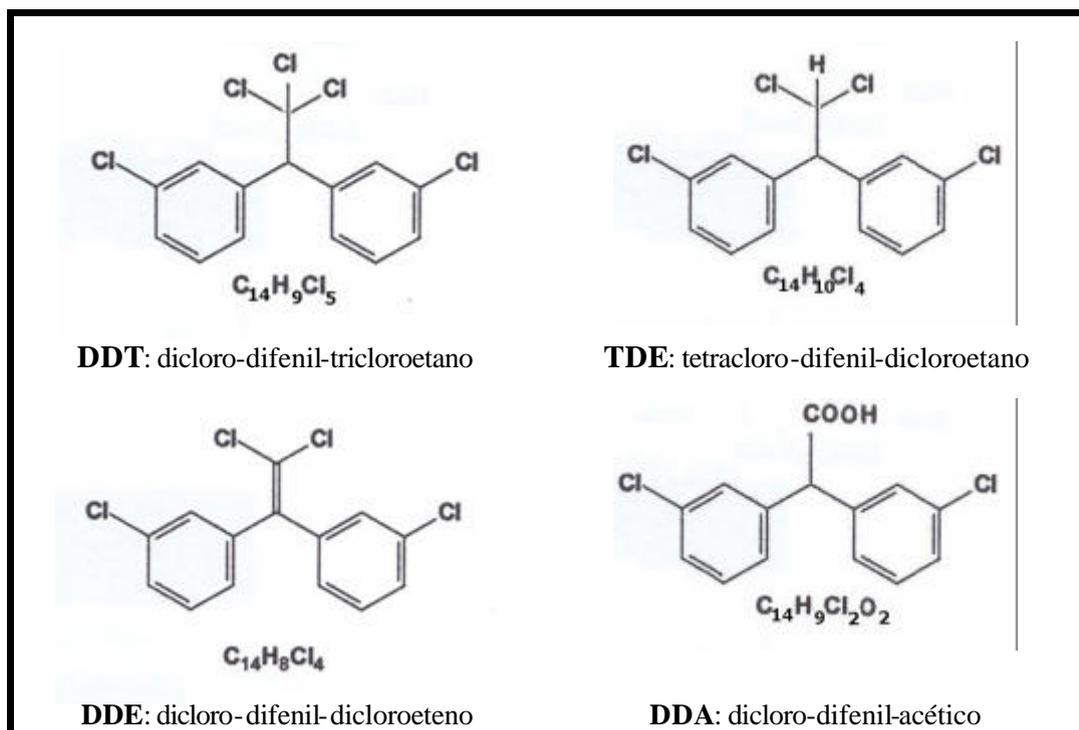


Figura 1: Estrutura química do DDT e de alguns análogos

O DDE é o metabólito do DDT mais importante nos insetos. Esta conversão é a maior causa de resistência ao DDT desenvolvido em moscas domésticas, besouros, lagarta rosada e em mosquitos *Aedes aegypti* (YOKOMIZO *et al.*,1985).

O Dicofol (cujas sinónímias são: CPCA; DTMC; FW 293) é também um acaricida organoclorado que foi reavaliado recentemente quanto ao efeito tóxico, para suspensão ou não se seu uso, constando na resolução – RDC n°135 de 17/05/02 e concluída em julho de 2002 (BRASIL, 2004b), sendo oficialmente liberado para uso agrícola indicado exclusivamente nas folhas de algodão, citros e maçã. A legislação estabelece valores de LMR (mg/kg) de 0,01 para o algodão e 5,0 para citros e maçã. Permitindo que o Dicofol venha contaminado com DDT, DDE e TDE em concentração máxima de 1.000 mg/kg (YOKOMIZO *et al.*,1985).

9.2 GRUPO DOS BHCs

Os BHCs pertencem a um grupo que também é conhecido como o grupo dos ciclohexanos hexaclorados (HCH) (FIDALGO *et al.*, 2003).

A síntese do BHC, em 1825, ocorreu bem antes da do DDT (1874), mas ambos tiveram reconhecimento como inseticida na mesma época, 1942 e 1939, respectivamente.

Mas foi em 1912, que ficou comprovado que o produto BHC era uma mistura de quatro isômeros: β -, α -, γ -, δ -BHC, sendo o γ -BHC o princípio ativo desta mistura.

Para o BHC contendo o isômero γ (gama) com pureza mínima de 99% (m/m) o termo Lindano, em homenagem ao cientista Van der Linden, foi usado. E a denominação BHC passou a ser usado para a mistura com pureza inferior a 99% (m/m) em γ -BHC (YOKOMIZO *et al.*,1985). Foi muito utilizado para o controle de insetos e pragas do solo, principalmente, de gafanhotos e da broca do café. No Brasil o seu uso foi proibido em 1983, mas o Lindano ainda é permitido em alguns casos, descritos mais adiante (BRASIL, 2003).

Através da **Figura 2** podem ser observadas as estruturas químicas de um BHC e do Lindano.

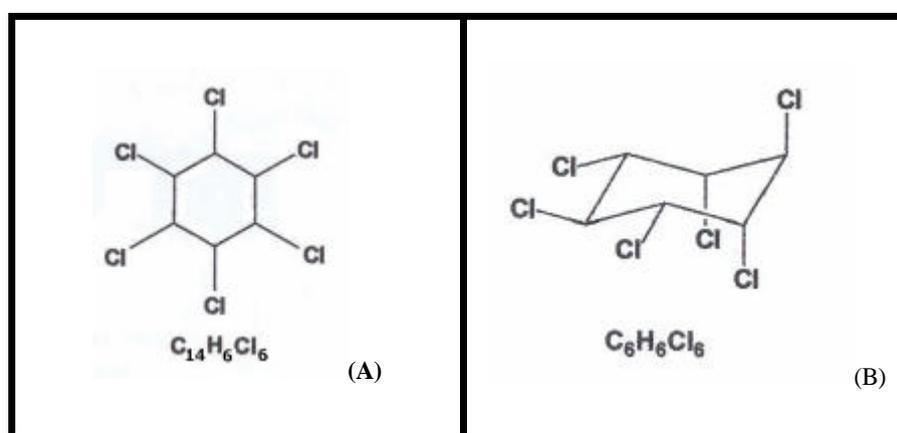


Figura 2 Estrutura química: (A) BHC (1,2,3,4,5,6-hexacloro ciclo hexano = HCH); (B) Lindano (γ -BHC)

O termo BHC deriva de sua obtenção: benzeno que foi hexaclorado, por reação de adição, expondo o benzeno ao cloro (gás) sob luz ultravioleta. Esta denominação é imprópria e gera confusão, já que não há o caráter aromático do anel. Este nome se reservaria ao benzeno contendo seis cloros (por reação de substituição) que constitui outra classe de agrotóxico HCB (hexaclorobenzeno). Porém, segundo Yokomizo e colaboradores (1985), o uso deste nome se tornou corriqueiro e consagrado, tanto na literatura quanto no campo e no comércio, e qualquer tentativa de mudança para HCH (1,2,3,4,5,6-hexacloro ciclohexano), como é timidamente conhecido, seria inútil.

De acordo com a legislação da ANVISA (BRASIL, 2003), o Lindano possui as seguintes sinônimas: γ -BHC, γ -HCH, DBH, BBH, HCCH, γ -Hexaclorano, e seu uso é permitido na agropecuária em aplicações em partes aéreas e/ou sementes das culturas de algodão, bulbos, cacau, café, cana-de-açúcar, coco, frutas em geral (exceto morango), hortaliças, leguminosa, mandioca. Tratamento do solo durante o plantio de cereais e de citros. Aplicação tópica em animais de criação exceto em fase de lactação. Tendo seu LMR

variando de 0,1 ppm para citros, hortaliças e leite até 1 ppm para frutas, leguminosas e cacau.

O Lindano é um inseticida que possui persistência média no meio ambiente, com deslocamento para regiões vizinhas, toxicidade para mamíferos (BRASIL, 2003) e possui como principais metabólitos, o pentaclorociclohexeno (PCC) e o 1,2,4-triclorobenzeno (YOKOMIZO *et al.*,1985).

9.3 GRUPO DOS CICLODIENOS (YOKOMIZO *et al.*,1985)

Os ciclodienos foram desenvolvidos logo após a segunda guerra mundial, nos Estados Unidos e na Alemanha, sendo os principais: Heptacloro, Aldrin, Isodrin, Dieldrin, Endrin. Os mais recentes são o Endosulfan e o Dodecacloro (Mirex).

Os ciclodienos são hidrocarbonetos cíclicos clorados, que possuem uma ponte de dicloroendometileno, e são produzidos por reação de um ciclopentadieno com o etileno para produzir o norboneno (Reação de Diels-Alder).

O nome Aldrin foi dado em homenagem a Kurt Alder, e Dieldrin a Otto Diels, ambos químicos alemães, que em 1928 desenvolveram trabalhos sobre reações de adição de dienos, sendo agraciados pelo Premio Nobel de Química, em 1950.

Através da **Figura 3** podem ser observadas as estruturas químicas do Aldrin e do Dieldrin.

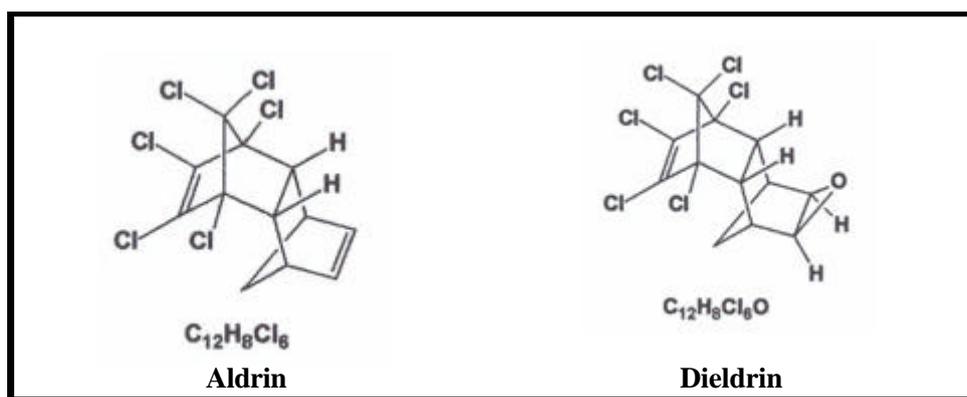


Figura 3 Estruturas químicas do Aldrin e do Dieldrin

Os ciclodienos variam grandemente em toxicidade, para os mamíferos, não diferenciando tanto para os insetos, sendo no geral de toxicidade semelhante ao DDT.

A metabolização dos ciclodienos se dá, geralmente, por epoxidação de duplas, encontrando-se, junto ao composto original, epóxidos acumulados em tecidos adiposos dos mamíferos. Após tratamentos de animais com Aldrin, foram encontradas concentrações consideráveis de seu epóxido, o Dieldrin, em carnes de boi, porcos, carneiros, ratos brancos, aves domésticas e em leite de vaca.

Um organoclorado deste grupo, mais recente é o Mirex cujas sinonímias são: percloropentaciclodecano, hexaclorociclopentadieno, perclorodihomocubano, declorano e dodecacloro. Este agrotóxico tem seu uso autorizado especificamente como formicida (BRASIL, 2004b).

Através da **Figura 4** pode ser observada a estrutura química do Mirex.

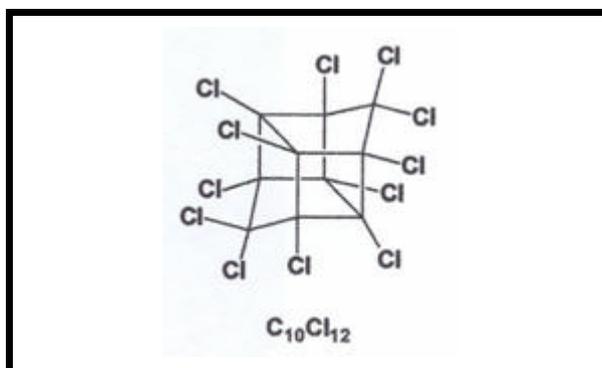


Figura 4 Estrutura química do Mirex

10 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS ORGANOCLORADOS

Em geral, a toxicidade dos pesticidas em ambientes naturais é bastante elevada, mesmo em baixas concentrações. Devido a isto, os limites permitidos pelos órgãos de fiscalização ficam em torno de décimos de mg/kg (SANTOS, 2003).

Para determinação de limites tão baixos, faz-se necessário o uso de métodos analíticos que sejam suficientemente sensíveis. Além disso, devido à complexidade das análises de determinadas amostras ambientais e de alimentos, torna-se necessário escolher uma técnica própria para realizar a separação (extração) dos compostos antes da análise propriamente dita (SANTOS, 2003).

A extração compreende o isolamento dos analitos de interesse da matriz, pois suas concentrações são muito baixas em relação aos constituintes da amostra, quase sempre interferentes (lipídeos, pigmentos, vitaminas e etc). Deve-se levar em conta que os analitos,

durante esta fase, devem ser preservados de danos, dando possibilidades de estabilidade até o momento da análise ser realizada.

Segundo Santos (2003) as principais técnicas utilizadas na análise de resíduos de agrotóxicos são:

Extração líquido-líquido (ELL)
Extração em fluido supercrítico (EFC)
Extração em fase sólida (EFS)
Micro-extração em fase sólida (MEFS)

10.1 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ELL)

Os métodos que usam ELL baseiam-se na partição entre líquidos imiscíveis. Segundo YOKOMIZO, *et al* (1985), os principais métodos oficiais de análise de organoclorados por CG baseiam-se em extrações ELL, constituindo-se das fases:

- 1) Extração do pesticida
- 2) Purificação dos extratos
- 3) Concentração dos extratos
- 4) Identificação e quantificação dos analitos.

Para a execução destas fases, usa-se uma série de vidrarias que devem estar cuidadosamente limpas para não ocorrer contaminações. Materiais de borracha ou plásticos não devem ser usados para não ocorrer o arraste de monômeros, que como os analitos de interesse vão ser concentrados e analisados (YOKOMIZO, *et al* 1985).

- 1) Extração: Para a extração escolhe-se um solvente, ou uma mistura de solventes, apropriada de acordo com a polaridade do analito. No caso dos agrotóxicos organoclorados, o hexano (ou a mistura de hexano-acetona) é o mais utilizado. O diclorometano, clorofórmio e acetonitrila são mais indicados quando se deseja extrair analitos mais polares (YOKOMIZO, *et al* 1985). Para minimizar a presença de interferentes, quase sempre arrastados com o solvente, deve ser realizada a purificação.
- 2) Purificação (*clean up*): para a purificação existe uma série de processos e os mais frequentes são: partição com solventes imiscíveis; cromatografia de adsorção (florisil, carvão, alumina ou gel de sílica); permeação em gel; destruição química do interferente; co-destilação. Cuidados adicionais têm que haver para que não ocorram perdas de amostra e contaminações nesta fase (YOKOMIZO *et al.*, 1985).

- 3) Concentração do extrato: nesta fase deve-se controlar a temperatura para causar um mínimo de perdas. A concentração do extrato, geralmente na ordem de 100:1 é feita em tubos concentradores sobre banho de vapor. A quantidade de solvente deve ser controlada também, uma vez que sempre existe a possibilidade de ser fonte de contaminação de interferentes.
- 4) Identificação e Quantificação: os métodos de identificação e quantificação, quase sempre, são por cromatografia gasosa (CG). Mas existem ainda os espectrofotométricos e biológicos, menos sensíveis e específicos, respectivamente, do que o CG. As colunas para CG são apolares e os detectores para organoclorados costumam ser de captura de elétrons (DCE) (SANTOS, 2003).

De acordo com Santos (2003), extrações ELL têm muitas desvantagens, tais como ser trabalhosa, demorada e com manuseio de elevados volumes de solventes orgânicos.

10.2 EXTRAÇÃO EM FLUIDO SUPERCRÍTICO (EFC)

A extração EFC é realizada através da passagem de um fluido (gás em elevada temperatura e pressão), em compartimento fechado (estático) ou aberto (dinâmico).

Nestas condições o fluido consegue permear a amostra com maior propriedade do que o líquido (devido a sua menor viscosidade e maior difusão) e do que o gás (por possuir maior densidade e poder de solvatação) (SANTOS, 2003).

Com este tipo de extração, é possível isolar compostos orgânicos em amostras sólidas. Em 90% dos casos, usa-se o CO₂, cuja polaridade é similar à do pentano, sendo adequado para a extração de compostos apolares. Para compostos polares, pode-se usar N₂ ou H₂O (SANTOS, 2003).

De acordo com o autor, esta técnica tem as seguintes vantagens, em relação a extração ELL: não ocorre diluição da amostra, é mais rápida e seletiva e dispensa o uso de solventes orgânicos. Mas no geral, apresenta a desvantagem de não poder ser realizada em campo, usar gás em grandes quantidades e com alto grau de pureza, tornando a análise muito dispendiosa além de não ser tão rápida (não levando menos do que uma hora para ser realizada).

10.3 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (EFS)

A extração EFS é realizada através da passagem da amostra em uma fase estacionária (superfície sólida adsorvente) e seu princípio, a partição, é o mesmo da cromatografia líquida. Os analitos de interesse são retidos, por interações reversíveis, no material adsorvente e desorvidos ao passar solventes apropriados para a eluição.

As diversas vantagens que este método oferece, de acordo com Santos (2003), tornam o método EFS o mais utilizado atualmente em análise de agrotóxicos em amostras ambientais. Além de reduzir o manuseio com solventes orgânicos, o método é menos trabalhoso do que a extração ELL. Para substâncias com relativa polaridade o método EFS é mais adequado do que ELL, pois recuperações por este último costumam ser baixas devido à solubilidade parcial destas substâncias em água. Outra vantagem, aponta o autor, é que esta técnica oferece a possibilidade de ser facilmente feita em campo, agilizando a extração das substâncias e evitando perdas devido à degradação do material. Vários estudos têm demonstrado que a maioria das substâncias orgânicas pré-concentradas no adsorvente apresenta boa estabilidade, podendo ser armazenadas antes de proceder a análise.

Nos últimos anos, vários procedimentos para extração de resíduos de agrotóxicos de diferentes matrizes têm sido desenvolvidos com o intuito de reduzir o consumo de solventes. Neste particular, a extração em fase sólida (EFS) é mais vantajosa que a extração líquido-líquido (ELL) e pelos motivos apontados como principais, que são o fato de ser muito mais econômica e o de ser menos sujeita a contaminações, tem sido ultimamente a técnica mais usada.

10.4 MICRO-EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (MEFS)

A extração por MEFS é uma alternativa rápida para substituir técnicas convencionais de extração (QUINTEIRO, *et al.* 2003).

A MEFS é realizada através do contato da amostra com uma fase estacionária de pequeníssimo volume (0,7 µL), não necessitando de uso de solventes e de grandes volumes de amostra (no mínimo 1 mL). Esta técnica é aplicável para análise de resíduos de agrotóxicos em diversas matrizes (sólidas, líquidas e gás), sendo capaz de gerar rapidamente resultados, com precisão e exatidão aceitáveis, e baixos limites de detecção (QUINTEIRO, *et al.* 2003).

No **Capítulo II** é apresentada uma revisão sobre a MEFS.

11 CONCLUSÃO

Em todo o mundo, o aumento da produção agrícola tem ocorrido às expensas da exploração intensiva do solo, gerando mudanças adversas, propiciando a infestação de pragas em várias culturas produtivas, causando danos econômicos a todo ecossistema.

Com esta prática predatória, os proprietários rurais se vêem obrigados a aumentar o uso de pesticidas, muitas vezes reduzindo o intervalo estabelecido para aplicação de novas doses. Esta prática tem levado ao acúmulo de defensivos agrícolas no meio ambiente,

contaminando o solo, os espelhos d'água e até as áreas virgens, ou seja, aquelas que nunca receberam aplicação de pesticidas.

Embora os agrotóxicos mais carcinogênicos, considerados poluentes de grande persistência, já tenham sido proibidos no Brasil (DDT, BHC, etc) a cautela nos obriga a tomarmos cuidados intensos no controle destes produtos. Alguns produtores ainda mantêm estoques destes inseticidas e algumas pesquisas mostram que outros grupos de agrotóxicos e seus metabólitos ainda desconhecidos podem vir causar câncer, principalmente, hepático em mamíferos.

A má prática agrônômica, isto é, o uso de produtos inadequados para a cultura em questão, doses exageradas e prazo de carência não cumprido aumentam o perigo para os trabalhadores e para o consumidor, que leva o produto agrícola para a mesa antes da degradação do agrotóxico. Neste sentido, os governos têm que ser mais rigorosos na exigência do cumprimento da legislação, oferecendo maior proteção ao consumidor.

Atualmente, a qualidade de todos os alimentos está intrinsecamente ligada, não só à sua composição nutricional e estado de conservação, mas também aos níveis residuais de elementos tóxicos ao homem. Um monitoramento freqüente destes resíduos é conveniente e necessário para que se tenha informação de um parâmetro de inocuidade dos alimentos, assegurando a saúde da população.

Neste sentido é importante procurar desenvolver e aplicar a filosofia das boas técnicas agrônômicas; educação ambiental; educação do consumidor; legislação com repressão pesada sobre os infratores; Análises Fiscais Rotineiras por Órgãos Oficiais competentes, para controle dos teores dos limites residuais máximos (LMR) em alimentos e em águas de consumo humano.

Torna-se importante também, a capacitação de um número maior de laboratórios, em relação aos poucos existentes, para realização destes tipos de análise, utilização de técnicas alternativas às convencionais, de baixo custo, com a obtenção de resultados mais rápidos, com baixos níveis de detecção e com a utilização de solventes em menor escala possível.

O estudo e o desenvolvimento da aplicação da extração MEFS em análise de resíduos de agrotóxicos em águas de consumo residencial e em vários tipos de alimentos merece atenção especial, pois tem mostrado ser capaz de oferecer tais vantagens.

12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (2004) NBR 12679:2003. Trata de Agrotóxicos e afins – produtos técnicos e formulação. Agrotóxicos e defensivos agrícolas, p. 97.

ALMEIDA, P. L. Sai pra lá praga. *Revista Ciência Hoje das Crianças*. [2000]. Disponível em: <<http://www.cnps.embrapa.br/search/mirims/mirim02/praga.htm>>. Acesso em: 06 ag. 2003.

ANDRADE, M.J.F.V. *Economia do meio ambiente e regulamentação: análise da legislação brasileira sobre agrotóxicos*. Dissertação defendida na Escola de Economia da Fundação Getúlio Vargas; . Rio de Janeiro, 1995.

BRASIL (1989) Congresso Nacional. Lei n.7802 de 11/07/89 DOU: 12/07/89. “Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem, e a rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos das embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins e dá outras providências”. Alterada pela Lei 9974 de 06/07/2000, regulamentada por Decreto n. 4074 de 04/01/2002, DOU: 08/01/2002.

BRASIL (1997) Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa e inspeção Vegetal. Coordenação de fiscalização de agrotóxicos. *AGROFIT 97, sistema de produtos fitossanitários*. Brasília, DF: Laboratório de Resíduos de Pesticidas, ISDF.

BRASIL. (2003). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Acessoria de imprensa da ANVISA. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>: Acesso em: 10 out. 2003.

BRASIL. (2004 a) Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Acessoria de imprensa da ANVISA. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>: Acesso em: 13 mai. 2004.

BRASIL (2004b) Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agrotóxico e Legislação Brasileira. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias>> Acesso em: 02 ab.2004.

BENATO, E. A. *Anais do II Simpósio de Controle de Doenças de Plantas: Patologia Pós-Colheita de Frutos e Hortaliças*, Universidade Federal de Lavras, MG, (p.40-45) 182 p, 21 a 23 de outubro de 2002

BULL C, HATTAWAY, D. *Pragas e venenos: agrotóxicos no Brasil e no Terceiro Mundo*. Petrópolis: Vozes; 250 p.1986.

CHITARRA, A. B. *Anais do II Simpósio de Controle de Doenças de Plantas: Patologia Pós-Colheita de Frutos e Hortaliças*, Universidade Federal de Lavras, MG, (p. 19) 182 p, 21 a 23 de outubro de 2002

COMÉRCIO de agrotóxicos cresce 21,6%. [2002]. Disponível em: <www.herbario.com.br/bot/agri/agrotx.htm>. Acesso em: 06 ag. 2003

CORDEIRO, A.; PETERSEN P. ; ALMEIDA S. G.. *Crise socioambiental e conversão ecológica da agricultura brasileira*, Rio de Janeiro: AS-PTA, 1996.

DIHAM B. *The pesticide hazard: a global health and environmental audit*. London; Zed Books; 1993.

DUGAY, J; MIEGE, M.C.; HENNION, C. Effect of various parameters governing solid-phase microextraction for the trace determination of pesticides in water. *Journal of Chromatography A*, v.795, p.27-42, 1998.

EL SEBAE, A. H. Special Problems experienced with pesticide use in developing countries. *Regul. Toxicol. Pharmacol*, v.199, n.17, p.287-291, 1997.

FERREIRA, H.S. Pesticidas no Brasil: impactos ambientais e possíveis conseqüências de sua interação com a desnutrição humana. *Rev Bras Saúde Ocup*. v.80, p.51-60; 1993.

FIDALGO, N.U.; CENTINEO, G.; GONZALEZ, E.B.; MEDEL, A. S.; Solid-phase microextraction as a clean-up and preconcentration procedure for organochlorine pesticides determination in fish tissue by gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Chromatography*, v.1017, n.1-2, p.35-44, 2003.

FOWLER, R. B.; MIEWEGLOWSKI, A. M.; MEDEIROS, M. L.- Levantamento quantitativo e qualitativo dos princípios ativos de agrotóxicos utilizados e das principais culturas agrícolas nas bacias hidrográficas do Paraná no ano de 1984 - Superintendência dos Recursos Hídricos e Meio Ambiente - *Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento - Serviço de Ecologia - Edição da SUREHMA*, 95 p, 1989.

FIOCRUZ – FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Sistema Nacional de Informação Tóxico-Farmacológica. *Estatística anual de casos de intoxicação e envenenamento*. 74p. Rio de Janeiro, 1993.

GARCIA E.G. *Segurança e saúde no trabalho rural com agrotóxicos: contribuição para uma abordagem mais abrangente*. Dissertação defendida na Faculdade de Saúde Pública da USP. São Paulo, 1996.

GÁS Sarin. [2004?]. Disponível em: <http://www.geocities.com/gas_toxico/sarin.htm>. Acesso em: 07 mai. 2004.

GUIVANT, J. S. Percepção dos olericultores da Grande Florianópolis (SC) sobre os riscos decorrentes do uso de agrotóxicos. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, v.22, n.82, p.47-57, 1994.

HENZ, G. P. *Anais do II Simpósio de Controle de Doenças de Plantas: Patologia Pós-Colheita de Frutos e Hortaliças*, Universidade Federal de Lavras, MG, (p. 19-22) 182 p, 21 a 23 de outubro de 2002.

HISTÓRIA dos agrotóxicos. [2003?]. Disponível em: <<http://www.planetaorganico.com.br/agrothist1.htm>>. Acesso em: 06 ag. 2003.

JEYARATMAN, J. Occupational health issues in developing countries. In: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Public health impact of pesticides used in agriculture*, p. 207-212, 1990.

LIMA, A. F.; RACCA-FILHO, F. *Dicionário de Pragas e Praguicidas: aspectos legais toxicológicos e recomendações técnicas*. Edição dos Autores, 1ª Edição, Rio de Janeiro, 125p, 1987.

LOOSLI, R.; Triazines; *Toxicology*, v. 91, p.59-62, 1994.

LUKE, A. M.. FROBERG, J.; MASUMOTO, H.T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen e hidrocarbon pesticides in produce for determination by GC. *JAOAC*, v.58, n.5, p.1020-1026, 1975.

MACHADO NETO, J.G. Quantificação e controle da exposição dérmica de aplicadores de agrotóxicos em culturas estaqueadas de tomate, na região de Cravinhos-SP; *Tese defendida na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da UNESP*; Jaboticabal (SP);1990.

OPAS/OMS – Organização Pan-Americana da Saúde e Organização Mundial da Saúde. Manual de Vigilância de Populações Expostas a Agrotóxicos.[1996]. Disponível em: <<http://www.opas.gov.br>>. Acesso em: 20 mar.2003.

QUINTEIRO, L.M.C.; NOBRE, A.L.R.; FERREIRA, A.B.B.; GODOY, R.L.O.; CASTRO, I.M. Micro-extração em fase sólida: fundamentos e aplicações em análise de alimentos. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v.21, n.1, p.1-30, 2003

RÜEG, E. F., *Impacto dos agrotóxicos sobre o ambiente, a saúde e a sociedade*. São Paulo; Ícone; 1991.

SANTOS, T.C.R. *Análise de Resíduos de Pesticidas*. Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais. Apostila de curso ministrado de 22 a 24 de Setembro de 2003.

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Agrícolas. [2004?]. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br>>. Acesso em 07 mai. 2004.

TOLEDO, H. H. B., INOMATA, O. N. K. & LEMES, V. R. R. *Análise de Resíduos de Pesticidas*, no Instituto Adolf Lutz, São Paulo. Apostila do curso ministrado de 06 a 07 de março de 1997.

TORQUILHO, D.F. *Avaliação de Resíduos de Carbofuran e Tebuconazole em banana para exportação*. 2001. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, IT, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.

TRAPÉ, A. Z. O caso dos agrotóxicos. In: Rocha, *et al. Isto é trabalho de gente? vida, doença e trabalho no Brasil*. Petrópolis, Vozes, p. 568-593, 1993.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R. M. AND PEAKAL, D. B., *Principles of Ecotoxicology*. 1st edition, Taylor & Francis Ltd., London, 1996.

WILKINSON, J. *Anais do II Encontro Brasileiro de Agricultura Alternativa*, Petrópolis, RJ, p.52-55, 2 a 6 de abril de 1985.

YOKOMIZO, Y.; LARA, W. H.; PUGA, F.; BATISTA, G.; CARVALHO, P. R. N.; BARRETO, H. C.; MALTONE, C. A.; DOEGE, M. *Resíduos de pesticidas em alimentos*. Campinas: Ital, 1985. 226p.

YUDELMAN, M.; RATTA, A. e NYGAARD, D. - Pest Management and Food Production - Looking to the Future - *International Food Policy Research Institute - Washington*, 53 p., 1998.

CAPÍTULO II

MICRO-EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

A micro-extração em fase sólida (MEFS) é considerada uma micro-técnica de extração e de pré-concentração de analitos, pois esses processos são realizados em uma escala muito pequena. Valente e Augusto (2000) descreveram a seguinte analogia para ilustrar o que ocorre em termos de escala: uma gotícula de solvente orgânico de 1 μ L, no máximo, seria colocada em 10,00 mL (10.000 μ L) de uma solução aquosa contendo os analitos que se deseja analisar. Essa pequena gota – que representa 0,01% do volume total – permaneceria imiscível na matriz, mesmo sob agitação. Analitos orgânicos, por sua afinidade com a gotícula, migrariam da matriz para a mesma, concentrando-se em seu interior, de acordo com os coeficientes de partição gotícula/matriz. Após um tempo determinado, a gotícula impregnada de analitos seria retirada do seio da matriz e levada para o interior do cromatógrafo para ser analisada. Como vantagem, a concentração da matriz permaneceria a mesma, devido à quantidade extraída de analito ser comparativamente pequena. Desse modo, outras extrações poderiam ser realizadas na mesma matriz, para dispor de replicatas estatisticamente confiáveis, já que a técnica é considerada não destrutiva.

Na MEFS, a gotícula é representada por uma micro-camada polimérica que reveste a superfície de um pequeno segmento (1 cm) de fibra ótica de sílica fundida que possui 4,5 cm de comprimento e 300 μ m de diâmetro externo. Tal camada – com volume de 0,03 a 1 μ L e espessura de 7 a 100 μ m – é considerada a fase estacionária imobilizada no suporte de fibra ótica (VALENTE & AUGUSTO, 2000).

Durante a amostragem, a fibra revestida é exposta no seio da matriz para entrar em contato com os analitos que, por partição, serão concentrados na fase estacionária (revestimento). Em um determinado momento, a fibra revestida é removida da amostra e inserida no cromatógrafo.

A técnica de MEFS foi desenvolvida entre 1989 e 1990 pelo Prof. Janusz Pawliszyn, da Universidade de Waterloo em Ontário, Canadá, para uso em cromatógrafo gasoso (CG), em análises de poluentes orgânicos voláteis e semivoláteis em águas (PAWLISZYN, 1997). Desde então, foram publicados vários tratamentos teóricos que fundamentam a técnica e trabalhos sobre a aplicação da MEFS em análises de amostras ambientais, de alimentos, forênsicas e botânicas, incluindo o uso de cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE).

1.2 OBJETIVO

O objetivo deste capítulo é descrever os principais aspectos que compõem a técnica de micro-extração em fase sólida (MEFS), a seringa modificada que conduz a fibra revestida, os diversos modos e procedimentos de extração e os principais parâmetros usados no desenvolvimento de métodos analíticos. Também é abordar as vantagens do uso da MEFS e suas aplicações na área de alimentos e análise de agrotóxicos.

2 APRESENTAÇÃO DO INSTRUMENTO

O instrumento completo para a micro-extração descrito por Valente & Augusto (2000), denominado de amostrador, encontra-se esquematizado na **Figura 5**.

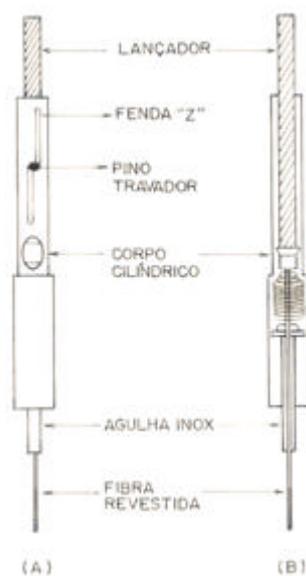


Figura 5 Vista externa (A) e interna (B) do instrumento, para MEFS

Como pode ser observado na **Figura 5**, o instrumento é uma seringa modificada que tem como função conduzir a fibra revestida. Ele é composto por um corpo cilíndrico com uma fenda em "Z" – por onde o pino travador desliza – apresentando na parte superior uma peça, denominada lançador e na inferior uma agulha oca de aço inoxidável. A agulha funciona como um canal, com 0,56 mm de diâmetro externo, por onde desliza o segmento de fibra óptica, fixada a um tubinho inox. O lançador, ao ser pressionado, empurra o tubo

inox para baixo, expondo assim a fibra e quando puxado recolhe-a para o interior da agulha.

O pino travador, fixado no lançador, acompanha esse movimento, de subida e descida na extensão da fenda em "Z". Na **Figura 5A**, pode ser observado que o pino travador está no centro da fenda, mantendo a fibra exposta. Para a fibra ser retraída é necessário deslocar o pino travador do centro, com um pequeno giro do lançador. Neste momento a mola (**Figura 5B**) se estenderá e empurrará o lançador para cima.

Na **Figura 6** encontra-se ilustrada a parte removível deste instrumento, que pode ser trocada de acordo com o seu estado de uso e/ou conforme a natureza do analito que se deseja extrair. No mercado encontram-se disponíveis fibras revestidas com fases estacionárias que variam de composição, polaridade e espessura.

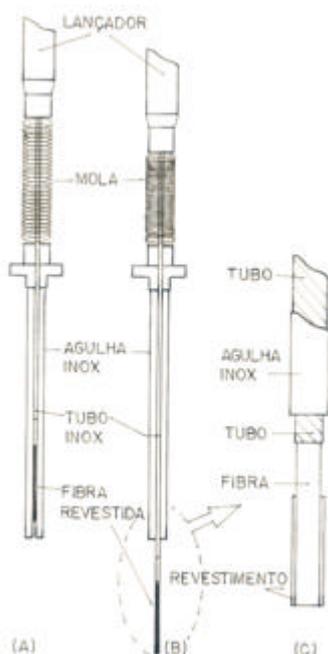


Figura 6 Parte removível do instrumento MEFS com a fibra escondida no interior da agulha (A); com a fibra exposta (B); parte inferior ampliada (C)

A parte removível (**Figura 6**) é composta pela agulha, pela fibra revestida, e por uma pequena mola que envolve uma das extremidades do tubo inox.

Na **Figura 6C** pode-se observar com mais detalhes que o tubo inox se encontra colado à fibra revestida formando um segmento contínuo e deslizável através da agulha.

A fibra ótica é frágil, podendo se quebrar com muita facilidade, razão pela qual o dispositivo apresentado na **Figura 6** foi projetado para que ela possa ser envolvida pela agulha, protegendo-se de operações que possam danificá-las no momento do transporte e da perfuração dos septos – do frasco de amostra e da porta do injetor do cromatógrafo (PAWLISZYN, 1997; VALENTE & AUGUSTO, 2000).

Em vários trabalhos da literatura podem ser encontradas descrições sobre a construção artesanal do dispositivo de MEFS, a partir de fibras óticas de sílica fundida que eram embutidas em seringas analíticas – de uso próprio para diluições – e, depois, ativadas por reações com ácidos e deposição de polímeros (ARTHUR *et al*, 1992; ARTHUR & PAWLISZYN, 1990; LOUCH *et al*, 1992).

Louch e colaboradores (1992) usaram amostradores manufaturados por sua equipe para análise simultânea de benzeno, tolueno e p-xileno, em águas. Nessa mesma época a automação em MEFS/CG estava sendo introduzida através de modificações no comprimento da agulha e do êmbolo de seringas Hamilton 7005 e do uso de um equipamento de CG modelo Varian 8100. Os resultados experimentais, assim obtidos, indicaram que a micro-extração pode ser apropriadamente usada na análise de líquidos como óleos, água e fluidos humanos, de sólidos como solo e de soluções gasosas como o ar (ARTHUR *et al*, 1992; LOUCH *et al*, 1992).

Enquanto os amostradores, até 1994, ainda não estavam disponíveis no mercado, a Polymicro Technologies (Tuscon, AZ, USA), em 1992, lançou a primeira fibra ótica revestida com polidimetilsiloxano (PDMS) nas espessuras de 56 e de 100 μm . No mesmo ano, um novo tipo de polímero foi apresentado: cristais líquidos de poliácrlato (PA) (LOUCH *et al*, 1992; POTTER & PAWLISZYN, 1992).

Em 1993, os amostradores para a micro-extração eram feitos, geralmente, com seringa de diluição Hamilton 7105 (VALENTE & AUGUSTO, 2000; ZHANG & PAWLISZYN, 1993).

Nesse mesmo ano, Page e Lacroix (1993) descreveram um método MEFS/GC para determinação de 33 substâncias halogenadas voláteis. Chai e colaboradores (1993) descreveram como construíram o amostrador para análise de hidrocarbonetos voláteis por MEFS.

Em 1995, agrotóxicos em água, solo e vinho foram analisados por essa técnica – a maioria por *headspace* – com sucesso, sendo indicada para a investigação de analitos polares, não-polares, voláteis, semivoláteis e não-voláteis (BOYD-BOLAND & PAWLISZYN, 1995). E, somente a partir desta época, os amostradores passaram a ser fabricados por firmas especializadas (BARNABAS *et al*, 1995), o que facilitou mais ainda a execução das análises tornando-as também mais precisas.

Nesta mesma época, três opções de fibras revestidas estavam disponíveis (PDMS de 7, de 30 e de 100 μm), e em 1996 a revestida com PA de 85 μm surgiu sendo todas

comercializadas pela Supelco (BARNABAS *et al.*, 1995; MAGDIC *et al.*, 1996). Nos anos seguintes outros materiais como Carbowax (CW), Carboxen (CAR) e Divinilbenzeno (DVB) surgiram para compor fases mistas, resultando em uma variedade maior de revestimentos de polaridade e porosidade específicas.

As características e sugestões de aplicação dos revestimentos, de acordo com a natureza do analito, são facilmente encontradas na literatura (ARMON, 1997; PAWLISZYN, 1997; VALENTE & AUGUSTO, 2000) e em notas técnicas dos fabricantes. A **Tabela 7**, extraída do artigo de Gorecki e colaboradores (1996) apresenta um resumo relacionando as fibras revestidas disponíveis e suas indicações.

Fibras óticas não revestidas também podem ser utilizadas para o processo de extração, mas as revestidas são as de uso mais freqüente, pois a base de seu emprego está no fato de que semelhante dissolve semelhante, o que resulta em maior seletividade (EISERT & LEVSEN, 1996). De acordo com Potter e Pawliszyn (1992) é importante considerar também que revestimentos mais espessos possuem maior capacidade de extração e boa seletividade.

Tabela 7 Revestimentos comercialmente disponíveis e indicações de uso

Revestimento	Espessura (µm)	Natureza	Aplicações sugeridas
PDMS	7		Substâncias apolares de alto peso molecular
PDMS	30	Não polar	Substâncias semi-voláteis não polares
PDMS	100		Substâncias voláteis
PA	85		Substâncias semi-voláteis polares
CW/PA	50		Substâncias surfactantes
CW/DVB	65	Polar	Álcoois e compostos polares
CW/DVB	70		Álcoois e compostos polares
CAR/DVB	50; 30		Flavorizantes (voláteis e semi-voláteis)
PDMS/DVB	60		Aminas; compostos polares
PDMS/DVB	65	Bipolar	Voláteis; amina s; nitroaromáticos
PDMS/DVB	65		Voláteis; aminas; nitroaromáticos
CAR/PDMS	75		Gases; compostos de baixo MM
CAR/PDMS	85		Gases; compostos de baixo MM

PDMS = polidimetilsiloxano; CW = carbowax; DVB = divinilbenzeno; PA = poliacrilato; CAR = carboxen MM = massa molecular

Fonte: Gorecki e colaboradores (1996)

3 ETAPAS QUE COMPÕEM O PROCEDIMENTO MEFS

A operação da micro-extração (MEFS) pode ser dividida em duas etapas: extração e dessorção (PAWLISZYN, 1997).

3.1 EXTRAÇÃO

A extração do analito é a primeira etapa do processo analítico e inicia-se quando os analitos (voláteis ou não) começam a migrar para a fibra (fase estacionária), obedecendo o fenômeno de partição, que tende ao equilíbrio. A migração começa a ocorrer assim que a fibra entra em contato com os analitos.

Quanto ao contato entre a fibra e a amostra, onde os analitos se encontram, existem dois modos de se realizar a extração por MEFS: por imersão direta (ID), mergulhando a fibra na amostra – conhecida como MEFS-ID ou por imersão na atmosfera confinada que fica em cima da amostra (HS, do inglês *headspace*) – conhecida como modo MEFS-HS. A escolha de um destes modos deve ser feita em função, principalmente, do estado físico da matriz, da afinidade do analito com a matriz e de sua volatilidade (PAWLISZYN, 1997).

No procedimento MEFS-ID, a fibra revestida é inserida no seio da amostra, sólida, líquida ou gasosa acondicionada em frasco com tampa selada, seguindo a seqüência operacional ilustrada na **Figura 7**, constituída de 1^o = Perfurar o septo que veda o frasco que contém a amostra, através da agulha do amostrador; 2^o = Expor a fibra no interior da matriz, por um determinado tempo, para se processar a extração de analitos; 3^o = Recolher a fibra; 4^o = Retirar a agulha.

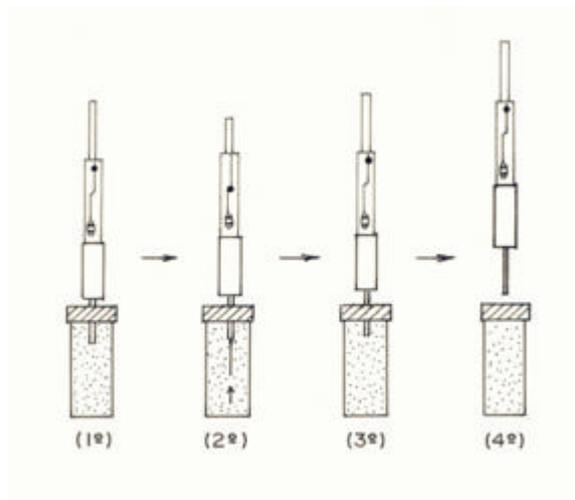


Figura 7 Esquema sequencial da extração MEFS-ID

Após a quarta fase, o amostrador é levado para outra etapa – a dessorção, que é descrita mais adiante. Um modo variante da abordagem direta é o uso de fibras envolvidas com uma membrana protetora, o que evita danos no revestimento da fibra no caso de amostras ricas em partículas sujeitas a ficarem aderidas na fibra (PAWLISZYN, 1997).

No modo MEFS-HS a fibra revestida é inserida no espaço gasoso confinado acima da amostra (sólida ou líquida) contida em frasco muito bem selado para que ocorra a migração dos analitos voláteis ou semivoláteis da amostra para o *headspace* e deste para a fibra (BARNABAS *et al.*, 1995; MAGDIC *et al.*, 1996; PAWLISZYN, 1997). Já que a fibra não entra em contato com a amostra diretamente, este procedimento torna-se uma alternativa para extrações em amostras particuladas, permitindo, também, modificações na matriz, como mudança de pH e concentração de sal, sem prejudicar a fase extratora. . Em comparação com o modo ID, o HS precisa de um tempo menor, para que o equilíbrio de extração seja atingido. Este procedimento, no entanto, tem sua aplicação limitada, não podendo ser aplicado no caso de analitos não voláteis, pois, devido à baixa pressão de vapor que possuem (em relação aos voláteis) transferem-se com pouca propriedade para a atmosfera confinada em cima da amostra. (EISERT & LEVSEN, 1996; PAWLISZYN, 1997; ZHANG & PAWLISZYN, 1993).

3.2 DESSORÇÃO

A dessorção é a segunda etapa do processo MEFS. Corresponde ao momento voltado para o desprendimento forçado dos analitos da fibra, podendo ser térmico, em CG, ou ser feito por solventes que continuamente passam pela interface MEFS/CLAE (PAWLISZYN, 1997). A **Figura 8** representa um esquema da seqüência operacional para a dessorção térmica.

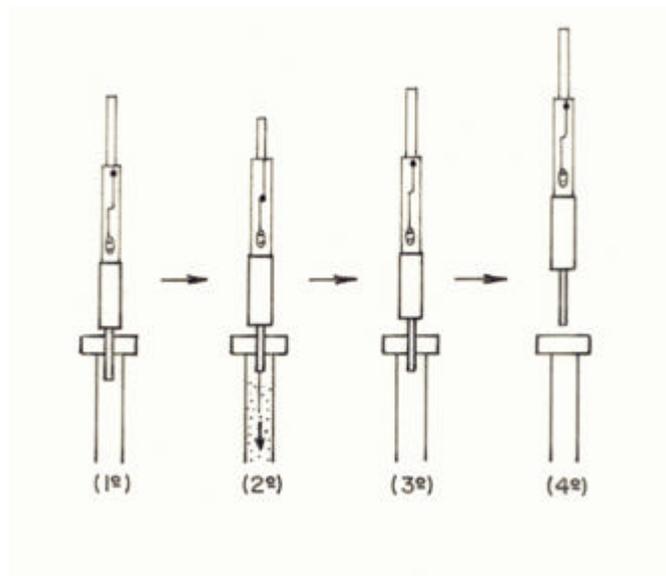


Figura 8 Esquema sequencial da dessorção em CG

Na **Figura 8** pode ser observado que a sequência operacional do processo de dessorção é simples: 1^ª = Perfurar o septo que veda a porta do injetor do CG através da agulha do amostrador; 2^ª = Expor a fibra, por um tempo determinado, para se processar a dessorção dos analitos; 3^ª = Recolher a fibra; 4^ª = Retirar a agulha. O *start* no equipamento é acionado a partir do momento em que a fibra é exposta no interior do CG. Os analitos dessorvidos são carregados para subsequente análise cromatográfica (separação) e detecção.

Excelentes sinais cromatográficos são produzidos quando são utilizados, no injetor do CG, altos fluxos de gás carreador e uma temperatura máxima (respeitando a característica de estabilidade do revestimento de fibra) ou altos fluxos de solvente carreador na interface MEFS/CL no caso da cromatografia líquida (ARMON, 1997; PAWLISZYN, 1997).

4 PRINCIPAIS ASPECTOS ANALÍTICOS QUE FUNDAMENTAM A MEFS

Sob o ponto de vista analítico, não se deve esquecer que o material que reveste a fibra para a micro-extração pode ser considerado uma fase líquida imobilizada, e preparada para entrar em contato com outra fase (a amostra), competindo entre si pela solubilização do analito (PAWLISZYN, 1997). Logo, os fatores que afetam a eficiência das extrações líquido-líquido (ELL) convencionais também afetarão a MEFS (LOUCH *et al.*, 1992; PAWLISZYN, 1997). Alguns desses fatores, como volume, concentração e coeficiente de partição relacionam-se diretamente por uma equação analítica fundamental. Outros, como a temperatura e o pH, apesar de independentes da equação, afetam a eficiência da extração, o que é de se esperar, pois agem diretamente nas propriedades do fenômeno de partição.

No modo MEFS-ID, o fenômeno de partição do analito – estimado pelo coeficiente de partição do analito, $K_{F/A}$ – ocorre entre duas fases que competem entre si pelo analito: a fase estacionária (F), que é a fibra revestida, para onde os analitos migram e a fase aquosa (A), que é a solução aquosa onde os analitos se encontram e de onde eles são extraídos. Neste sistema bifásico, a quantidade de analito extraído, após equilíbrio alcançado, é expressa pela seguinte equação (ARMON, 1997; ARTHUR & PAWLISZYN, 1990; BARNABAS *et al.*, 1995; BOYD-BOLAND & PAWLISZYN, 1995; CHAI *et al.*, 1993; MAGDIC & PAWLISZYN, 1996; PAWLISZYN, 1997; ZHANG & PAWLISZYN, 1993):

$$n_F = \frac{K_{F/A} \cdot V_F \cdot V_A \cdot C_0}{K_{F/A} \cdot V_F + V_A} \quad (\text{I})$$

Onde:

n_F = quantidade extraída de analito pela fase revestida (fibra estacionária).

$K_{F/A}$ = coeficiente de partição do analito entre a fase estacionária e a fase aquosa.

V_F = volume da fibra revestida (fase estacionária)

V_A = volume da fase aquosa.

C_0 = concentração inicial do analito na da fase aquosa

Quando a MEFS é realizada no *headspace*, a fibra revestida (F) é inserida na atmosfera confinada (HS), localizada em cima da amostra ou matriz (A), onde os analitos, voláteis ou semi-voláteis, se encontram e de onde são extraídos. A amostra pode estar no estado sólido ou em solução aquosa. Neste procedimento, então, tem-se um sistema trifásico, onde todas as fases: matriz (A), *headspace* (HS) e fibra (F) competem entre si pelos analitos, e a equação fundamental passa a ser:

$$n_F = \frac{K_{F/A} \cdot V_F \cdot V_A \cdot C_0}{K_{F/A} \cdot V_F + V_A + K_{HS/A} \cdot V_{HS}} \quad (\text{Ia})$$

O novo termo $K_{HS/A}$ representa o coeficiente de partição do analito entre o *headspace* e a matriz e V_{HS} é o volume do *headspace* (PAWLISZYN, 1997). O coeficiente $K_{HS/A}$ depende da volatilidade do analito.

Procedimentos que influenciam a quantidade de analito extraída

Agitar a solução-amostra no momento da extração por MEFS-ID ou MEFS-HS, é necessário, na maioria das vezes, para facilitar o transporte dos analitos da solução para a fase estacionária (fibra) e, assim, reduzir o tempo de equilíbrio. Dentre os meios de agitação existentes – magnética, por agitador Vortex, por fluxo, por ultra-som e por vibração da fibra – a mais comumente usada é a primeira, pois é a mais simples, não necessita de dispositivos complexos e não adultera a amostra (PAWLISZYN, 1997; VALENTE & AUGUSTO, 2000).

A avaliação da melhor fibra para extração MEFS é essencial, devendo ser criteriosa, pois a sensibilidade da técnica, para um dado analito, depende do coeficiente de partição ($K_{F/A}$) – que expressa a afinidade do analito pela fibra – e, também, da espessura do revestimento (V_F), ambos, se altos, produzirão baixos limites de detecção (PAWLISZYN, 1997).

O coeficiente de partição ($K_{F/A}$), o volume da amostra (V_A) e o volume da fibra (V_F) relacionam-se de forma muito interessante e conveniente na MEFS-ID.

De acordo com Pawliszyn (1997), para revestimentos com baixa afinidade pelo analito ($K_{F/A} < 1.000$), recomenda-se que V_A seja alto (maior do que 100 mL). Nesse caso, a soma representada no denominador da **equação I**, $K_{F/A} \cdot V_F + V_A$ sofre uma aproximação: $K_{F/A} \cdot V_F + V_A \cong V_A$, levando ao surgimento de uma nova expressão (**equação II**):

$$n_F = K_{F/A} \cdot V_F \cdot C_0 \quad \text{(II)}$$

Neste caso, a quantidade n_F torna-se independente de V_A , o que é importante em amostragens ambientais *in situ*. Neste tipo de amostragem o volume da amostra (atmosfera onde os analitos de interesse se encontram) é infinito.

Existem casos onde a fibra pode adsorver completamente os analitos, não estabelecendo situação de equilíbrio de partição. A dependência do equilíbrio de partição significa que o analito não se distribui mais entre a fase aquosa e a estacionária (fibra), já que ele é completamente adsorvido pela fibra (extração exaustiva). Isto ocorre quando se usam pequenos volumes de amostra ($V_A < 1,0$ mL) para extração com de uma fase estacionária de volume relativamente alto ($V_F \cong 10,0$ μ L) e alta afinidade pelo analito ($K_{F/A} \cong 10.000$). Neste caso ocorre uma nova aproximação no denominador da equação (I), $V_A + (K_{F/A} \cdot V_F) \cong K_{F/A} \cdot V_F$, surgindo nova expressão (**equação III**) a partir de nova simplificação da **equação I**:

$$n_F = V_A \cdot C_0 \quad \text{(III)}$$

A **equação III**, então, expressa a extração de analitos por MEFS-ID até exaustão independente do equilíbrio de adsorção pelo mesmo motivo acima descrito.

Uma vez que a partição varia com a temperatura e a composição das fases, o fator $K_{F/A}$ intrínseco ao modelo quantitativo, pode sofrer influências significativas com a mudança destes fatores, resultando, conseqüentemente, em níveis maiores ou menores de extração PAWLISZYN (1997). Com o aumento da temperatura, os analitos tendem a ser expulsos da matriz. Para extrações MEFS-HS tem-se a vantagem de oferecer extrações mais rápidas uma vez que os analitos passam para o *headspace* com maior velocidade. Esse procedimento, entretanto, pode reduzir a quantidade extraída de analito se a extração permitir, também, que o revestimento seja aquecido, o que não é desejável (ARMON, 1997; PAWLISZYN, 1997).

A adição de sal, geralmente cloreto ou sulfato de sódio, pode promover a extração, dependendo da natureza do revestimento (fase estacionária), do analito, da matriz (fase aquosa) e da concentração de sal. Considerando uma fibra revestida apolar, em geral, este efeito aumenta com a polaridade do composto (ARMON, 1997; PAWLISZYN, 1997). Isto ocorre devido à propriedade do sal que torna a molécula menos solúvel na água facilitando a sua migração para a fibra revestida. De acordo com LENHNINGER (1990), dependendo da concentração de sal pode ocorrer a precipitação de moléculas de alto peso molecular, como proteínas, devido à neutralização das cargas e este efeito é denominado de *salting out*.

Todos estes procedimentos relacionados com a quantificação (capazes de afetar a precisão e exatidão das análises), constituem a etapa de otimização da MEFS, que será realizada no **Capítulo III**.

5 BREVE COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE MICRO-EXTRAÇÃO E DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Duas são as técnicas principais que utilizam uma superfície sólida (fase estacionária) como instrumento de extração e de concentração que são: a extração em fase sólida (EFS) e a micro-extração em fase sólida (MEFS). As diferenças relevantes estão descritas na **Tabela 8**, são resultantes das variações que ocorrem entre os instrumentos, os procedimentos e o número de fases que envolvem ambos os processos.

6 VANTAGENS GERAIS DA MEFS SOBRE AS TÉCNICAS CONVENCIONAIS

São várias as vantagens da aplicação da MEFS para a determinações qualitativas, semi-quantitativas e quantitativas apresentadas na literatura (GORECKI *et al.*, 1996; CHAI *et al.*, 1993; LOUCH *et al.*, 1992; PAWLISZYN, 1997), pois torna possível:

- a) Detectar rapidamente (*screening*) os analitos em níveis da ordem de ng/L.
- b) Realizar quantificações em níveis da ordem de ng/mL
- c) Reduzir até 70% o tempo necessário à preparação da amostra.
- d) Reduzir o custo da análise e os riscos à saúde, pois é praticamente livre de solventes, os quais são necessariamente de alta pureza e geralmente tóxicos.
- e) Concentrar vários analitos de interesse, simultaneamente.
- f) Extrair sem fazer emulsões, como normalmente ocorre nas extrações ELL.
- g) Extrair de modo não exaustivo, pois a MEFS é uma técnica de equilíbrio.
- h) Extrair de modo não destrutivo, permitindo que ocorram outras análises.
- i) Analisar pequenos volumes de amostra (<1mL) com bons resultados.
- j) Realizar análises economicamente viáveis, pois o amostrador possui baixo custo e a fibra pode ser reutilizada por mais de 50 vezes.
- k) Realizar determinações MEFS/CG e/ou MEFS seguida de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- l) Manusear o instrumento MEFS sem dificuldades operacionais, podendo ser usado para amostragem em campo, pois é portátil.
- m) Realizar amostragens automatizadas.

Tabela 8 Extração EFS *vs.* Micro-Extração MEFS (só com a superfície sólida)

COMPARAÇÕES	EFS	MEFS
Volatilidade do analito	Limitado aos analitos fixos e semivoláteis	Fixos, semivoláteis e voláteis
Fase estacionária	Encontra-se sob a forma granulada, que preenche um tubo cilíndrico de plástico, com uma geometria mais complexa que a do MEFS, dificultando a entrada e a saída dos analitos.	É uma micro-camada polimérica que reveste um suporte de fibra ótica de poucos μm de diâmetro. Sua superfície extratora é mais uniforme e tem geometria mais simples.
Uso de solventes	Os solventes são acrescentados à amostra para extração e concentração. A evaporação do solvente resultará em um extrato concentrado, necessitando de <i>clean up</i> .	O uso de solventes é limitado ao preparo de soluções padrão.
Extração	É realizada quando a amostra passa através da fase estacionária. Geralmente precisa de um tempo maior que a MEFS, pois os analitos têm que ser extraídos da matriz até exaustão. Precisa-se de uma quantidade maior de amostra.	Ocorre quando a fase estacionária (volume máximo de 0,7 μL), é imersa na amostra, necessitando de menos tempo para completar esta etapa. Os analitos são adsorvidos e concentrados numa única etapa e suas extrações não são exaustivas.
Dessorção e análise	A dessorção ocorre fora do cromatógrafo quando a fase estacionária é percolada por solventes, para posterior concentração, antes da análise cromatográfica.	Pode ser realizada no CG ou no CLAE. Com os analitos expostos mais superficialmente a dessorção é mais rápida, ocorrendo nesta mesma fase a análise.
Fontes de perda de analito	Perdas são fáceis de ocorrer devido a capacidade que as paredes do tubo possuem de adsorver analitos. Dessorções malfeitas, incompletas e aquecimentos drásticos na etapa de evaporação do solvente, também são freqüentes fontes de perdas.	Pode ocorrer, se a extração e/ou a dessorção forem feitas em tempo menor que o determinado e/ou quando a fibra se encontra saturada.
Presença de interferentes	O surgimento de interferentes é comum de ocorrer, devido ao arraste de monômeros do tubo de plástico e devido à formação indesejável de produtos durante a evaporação do solvente.	Pode ocorrer, se a limpeza da fibra não for feita freqüentemente, principalmente em matrizes com grandes quantidades de açúcar, que em altas temperaturas caramelizam-se ao redor da fibra danificando-a.

Fonte: QUINTEIRO, *et al.* 2003.

7 APLICAÇÃO DA MEFS EM ANÁLISE DE ALIMENTOS

De 1990 a 1996, as pesquisas com MEFS estavam concentradas nas determinações de poluentes em águas, usando HS/CG, comprovando excelente sensibilidade para a análise de traços. Nesse mesmo período, trabalhos teóricos para embasar a técnica também surgiram (ARTHUR & PAWLISZYN, 1990; EISERT & LEVSEN, 1996; LOUCH *et al.*, 1992; PAWLISZYN, 1997).

A partir de 1996, a aplicação dessa técnica se expandiu para uma maior diversidade de matrizes, tais como: solos, ar, alimentos, plantas, cabelo, produtos farmacêuticos, saliva, urina e sangue (PAWLISZYN, 1997).

Compostos orgânicos voláteis (COV) são freqüentemente analisados em bebidas alcoólicas como vinho (GARCIA *et al.*, 1996; GARCIA *et al.*, 1997; GARCIA *et al.*, 1998; HAYASAKA & BARTOWSKY, 1999; MESTER *et al.*, 1998; ONG & ACREE, 1999; VAS *et al.*, 1998; WHITON & ZOECKLEIN, 2000), em cervejas (VAS, 1997; JELEN *et al.*, 1998; ENTON, 1998;), em vodka (LAY-KEOW *et al.*, 1996) e em whisky (LEE, *et al.*, 2001); em bebidas não-alcoólicas como suco de frutas (IBANEZ *et al.*, 1998; JIA *et al.*, 1998a; JORDAN *et al.*, 2001; SERVILI *et al.*, 1998; SONG *et al.*, 1998), em café (FREITAS *et al.*, 2001) e em leite (MARSILI, 1999; PAN *et al.*, 1995) e em alimentos como queijos (CHIN *et al.*, 1996; JOU & HARPER, 1998), méis (GUIDOTTI & VITALI, 1998), óleos vegetais (MAZZINI *et al.*, 2000) e carnes curadas (RUIZ *et al.*, 1998).

Pelo número de exemplos, pode-se verificar que as aplicações da MEFS em alimentos estão, geralmente, associadas à determinação de COV por HS-GC, mais especificamente, em análise de aromas – com maior freqüência em bebidas como vinhos, cervejas, vodka e sucos de frutas.

A análise de COV por MEFS-HS/CG mostrou ser útil na averiguação da autenticidade e da pureza dos alimentos e, até mesmo, de sua origem geográfica, como é o caso de azeites (MAZZINI *et al.*, 2000), cafés (FREITAS *et al.*, 2001), vodkas (LAY-KEOW *et al.*, 1996), vinhos (WHITON & ZOECKLEIN, 2000; VAS *et al.*, 1998) e de whiskies (LEE *et al.*, 2001). A presença de determinados COV em alimentos pode ser útil também para avaliar o estado de conservação do alimento e predizer se as etapas de seu processamento foram mal ou bem feitas.

Além de ser muito utilizada para avaliação da identidade do alimento, de uma maneira geral, a MEFS vem sendo aplicada para:

a) avaliar a produção de metabólitos bacterianos voláteis em alimento e alterações no seu aroma característico (DUCRUET *et al.*, 2001; MARSILI, 2000), funcionando como indicativos da estabilidade do alimento e da eficácia da embalagem durante o seu armazenamento;]

b) acompanhar a produção de aromas indicativos da influência que o calor exerce na qualidade de alimentos. O desenvolvimento de aromas agradáveis, durante os processos de torrefação do cacau e farinhas, por exemplo, indica a evolução das reações de Maillard (BRITO *et al.*, 2001; SIDES *et al.*, 2001), e aromas desagradáveis podem indicar

excessivos tratamentos térmicos de conservação (SERVILI *et al.*, 2000; PALMA-HARRIS *et al.*, 2001);

c) avaliar as alterações na qualidade sensorial de sucos de laranja devido aos processos de clarificação (JORDAN *et al.*, 2001) e de conservação por irradiação (XUETONG & GATES, 2001);

d) caracterizar o perfil de aromas agradáveis, para que seja avaliado o impacto produzido por culturas *start* na qualidade de produtos fermentados (TOMAINO *et al.*, 2001);

e) analisar o teor de álcoois e ésteres em bebidas alcoólicas, sendo ambos parâmetros de qualidade da fermentação (JELEN *et al.*, 1998).

Nonato e colaboradores (2001) apresentaram resultados do desenvolvimento de um método MEFS-HS para a determinação de compostos secundários de cachaças de cana-de-açúcar brasileiras. Os compostos investigados, álcoois superiores e acetato de etila, dentre outros voláteis – subprodutos da fermentação – são os mais importantes parâmetros indicativos da qualidade da cachaça. Ruiz e colaboradores (1998) reportam que COV desejáveis em carnes curadas, oriundos das degradações (oxidativas) de lipídeos e de aminoácidos (degradação de Strecker) foram satisfatoriamente extraídos por MEFS-HS para determinação da qualidade do processo de cura.

A técnica de MEFS mostra-se muito aplicável também na identificação de produtos em estado de deterioração através da determinação de COV responsáveis pelo odor desagradável, como aminas voláteis produzidas por microrganismos (JELEN *et al.*, 2000; NAKAI *et al.*, 1999) e substâncias secundárias voláteis, resultantes da oxidação de ácidos graxos (JONES, *et al.*, 1998).

Em seu trabalho, Marsili (1999) investiga os estágios da foto-oxidação lipídica em leite, acompanhando por MEFS-HS a formação de subprodutos voláteis, como aldeídos, cetonas, ésteres e álcoois de baixo peso molecular. Todas essas investigações são muito importantes para a avaliação do estado de conservação do alimento.

A determinação da produção de COV, por MEFS, também foi indicada para informar sobre alterações no valor nutricional dos alimentos e sobre a segurança alimentar, relacionada à presença de bactérias patogênicas e poluentes. Wada (2001) estudou as alterações de óleos de peixe, ricos em ácidos graxos polinsaturados.

Para a verificação da qualidade de águas, Valente e colaboradores (1998) determinaram derivados tri-halometanos e Jia e colaboradores (1998b) o clorofórmio.

Contaminações por benzeno e tolueno, foram investigadas por MEFS-HS/CLAE, com sucesso, em suco de frutas (CLASADONTE, *et al.*, 1997) e em óleos vegetais comestíveis (GIUFFRIDA *et al.*, 1999).

O grau de contaminação de alimentos por bactérias patogênicas, fontes potenciais de intoxicação e infecção alimentar, foi avaliado com sucesso através da determinação de

COV, emitidos por tais microrganismos (VERGNAIS *et al.*, 1998; OGIHARA *et al.*, 2000).

Outras vezes, as análises de COV por MEFS podem se tornar uma ferramenta alternativa em estudos de biossíntese da especificidade de enzimas por determinados substratos (WYLLIE & FELLMAN, 2000) e em avaliações da eficiência da produção fúngica de aromas naturais, usados como aditivos em alimentos (NILSSON *et al.*, 1996; VIANNA & EBELER, 2001).

No caso de substâncias pouco ou não voláteis, têm-se, por exemplo, a análise de cafeína em bebidas (HAWTHORNE *et al.* 1992; YANG *et al.* 1997); de fenóis em mel (CONTE *et al.* 1998); de isotiocianato (GANDINI & RIGUZZI, 1997) e estireno (FLAK & TSCHEIK, 1997) em vinhos.

Ao contrário do que ocorre com a análise de voláteis, por MEFS-HS, verifica-se que a aplicação de MEFS-ID em análise de resíduos contaminantes não voláteis ou semivoláteis em alimentos não é muito freqüente, ainda que bons resultados tenham sido obtidos.

Isto pode ser constatado pelo pequeno número de trabalhos publicados com MEFS-ID. As detecções de contaminações alimentares por substâncias de alto peso molecular como micotoxinas (ZARNBONIN *et al.*, 2001) e por metais, como o selênio (GUIDOTTI, 2000; GUIDOTTI & RAVAIOLI, 1999) e o mercúrio (MESTER *et al.*, 2000), são exemplos de aplicações da MEFS-ID que podem ser mais exploradas.

Ainda nesse contexto, verifica-se que são poucos os trabalhos sobre a contaminação de alimentos por agrotóxicos usando extração por EFS e por MEFS.

A maioria das publicações entre 1992 e 2004, referentes à determinação de agrotóxicos por MEFS está relacionada com organofosforados.

Os resultados apontam aplicações bem sucedidas nas análises deste grupo de pesticidas em méis (BLASCO, *et al.*, 2004; FERNANDEZ *et al.*, 2001; GALARINI *et al.*, 2000; JIMDNEZ *et al.*, 1998; VOLANTE *et al.*, 1998; VOLANTE *et al.*, 2001), em morangos (BASHEER, *et al.*, 2004; BLASCO, *et al.*, 2003; CAO, *et al.*, 2001; HU *et al.*, 1999; WENNRICH *et al.*, 2001), em vinhos (BOYD-BOLAND & PAWLISZYN, 1995; VITALI *et al.*, 1998; ZARNBONIN *et al.*, 2004), em vinhos e mostos (CARABIAS, *et al.*, 2003; CORREIA *et al.*, 2001, LOPES, *et al.*, 2004), em vegetais comestíveis (BASHEER, *et al.*, 2004; BELTRAN, *et al.*, 2003; BERRADA, *et al.*, 2004; WENNRICH & POPP, 2001) e no leite (ROHRIG & MEISCH, 2000).

Pesquisas comparativas com vários agrotóxicos, a maioria organofosforados, em água para consumo alimentar – comprovam que a análise por MEFS-ID/CG possui maior sensibilidade que EFS/CG (ARREBOLA, *et al.*, 2004; BACHERR, *et al.*, 2004; FRIAS, *et al.*, 2004; HERNANDES, *et al.*, 2004; LI, *et al.*, 2003; LUAN, *et al.*, 2004; POPP, *et al.*, 2003; QUEIROZ *et al.*, 2001; SAKAMOTO & TSUTSUMI, 2004; SHU, *et al.*, 2003; SOUZA & LANÇAS, 2003; SUN, *et al.*, 2003; VAZ, *et al.*, 2004; YU, *et al.*, 2004).

8 CONCLUSÃO

Pela quantidade de trabalhos existentes, verifica-se que são raros aqueles desenvolvidos para determinar agrotóxicos organoclorados por MEFS-ID em matrizes como alimentos e águas para consumo.

A capacidade que esta técnica possui em atender a necessidade de se dispor de métodos simples para análises quantitativas, ou para *screening*, de contaminantes em amostras ambientais como água e matrizes como sucos de frutas, vinhos, hortaliças, e mel, que são as mais sujeitas às várias fontes de poluição, com detecções, em níveis $\mu\text{g/mL}$, associado a outras vantagens como simplicidade, baixo custo e praticamente livre de solvente, tornam os estudos sobre otimização e validação de um método de extração por MEFS/CG altamente recomendáveis para ser aplicado em análises rotineiras de agrotóxicos em água e alimentos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARREBOLA, F.J., AGUADO, S.C, SANCHEZ, M. N, FRENICH, A.G., VIDAL, J.L.M. Pesticide residue analysis in waters by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Letters*, v.7, n.1, p:99-117, 2004.

ARMON, A.D. Solid Phase Microextraction for the Analysis of Flavors. In: *Techniques for analyzing food aroma*, New York: Marcel Dekker, 1997.p. 81-112.

ARTHUR, C.L.; KILLAM, L.; BUCHHOLZ, K.D.; PAWLISZYN, J. Automation and optimization of SPME. *Analytical Chemistry*, v.64, p.1960-1966, 1992.

ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. SPME with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, v. 62, p. 2145 – 2148, 1990.

BARNABAS, I.J.; DEAN, J.R.; FOWLIS, I. A.; OWEN S.P. Automated determination of s-triazine herbicides using SPME. *Journal of Chromatography*, v. 705, n.2, p.305-312, 1995.

BASHEER, C., SURESH, V., RENU, R., LEE, H.K. Development and application of polymer-coated hollow fiber membrane microextraction to the determination of organochlorine pesticides in water. *Journal of Chromatography A*, v.1033, n.2.;p213-220, 2004.

BELTRAN, J., PERUGA, A., PITARCH, E., LOPEZ, F.J., HERNANDEZ, F. Application of solid-phase microextraction for the determination of pyrethroid residues in vegetable samples by gc-ms *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.376, n.4, p.502-511, 2003.

BERRADA, H., FONT, G., MOLTO, J.C., Application of solid-phase microextraction for determining phenylurea herbicides and their homologous anilines from vegetables *Journal of Chromatography A*, v.1042, n.1-2.;p.9-14, 2004.

BLASCO, C., FERNANDEZ, M., PICO, Y., FONT, G., Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction for determining six organophosphorus insecticides in honey by liquid chromatography-mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, v.1030, n1-2.; p.77-85, 2004.

BLASCO, C., FONT, G, MANES, J., PICO, Y. Solid-phase microextraction liquid chromatography tandem mass spectrometry to determine postharvest fungicides in fruits. *Analytical Chemistry*, v.75, n.14, p.3606-3615, 2003.

BOYD-BOLAND, A.; PAWLISZYN, J. SPME of Nitrogen containing herbicides, *Journal of Chromatography*, v.704, p. 163-172, 1995.

BRITO, E.S.D.E.; PEZOA GARCIA, N.H.; AMANCIO, A.C.; VALENTE, A.L.P.; PINI, G.F.; AUGUSTO, F. Effect of autoclaving cocoa nibs before roasting on the precursors of

the Maillard reaction and pyrazines. *International Journal of Food Science and Technology*, v.36, n.6, p. 625-630, 2001.

CARABIAS, M. R.; GARCIA, H. C.; RODRIGUEZ, G. E.; SORIANO, B. F. E.; HERNANDEZ, M. J. Determination of herbicides, including thermally labile phenylureas, by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1002, n.1-2, p.1-12, 2003.

CAO, C. F.; WANG, Z.; URRUTY, L.; POMMIER, J. J.; MONTURY, M. Focused microwave assistance for extracting some pesticide residues from strawberries into water before their determination by SPME/HPLC/DAD. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n.11, p. 5092-5097, 2001.

CHAI, M.; ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J.; BELARDI, R.; PRATT, K. Determination of volatile chlorinated hydrocarbons in air and water with SPME. *Analyst*, v. 118, p.1501-1505, 1993.

CHIN, H. W.; BERNHARD, R. A.; ROSENBERG, M. Solid phase microextraction for cheese volatile compound analysis. *Journal of Food Science*, v.61, p.1118-1122, 1128, 1996.

CLASADONTE, M. T.; GUFFRIDA, R.; ZERBO, A.; CIRAOLO, L.; Determination of benzene and toluene in fruit juice by solid phase microextraction (SPME) and HPLC. *Rassegna Chimica*, v.49, n.5, p.345-352, 1997.

CONTE, L. S.; BORTOLOMEAZZI, R.; MORET, S.; SABATINI, A. G.; Marcazzan, G. L. Application of solid - phase microextraction in the determination of phenol in honey. *Riv. Sci. Aliment.*, v.26, n.3/4, p.97-102, 1998.

CORREIA, M.; DELERUE, M. C.; ALVES, A.; CAMOES, M. F. Development of a SPME-GC-ECD methodology for selected pesticides in must and wine samples. Euroanalysis XI. Proceedings of the European Conference on Analytical Chemistry, Lisbon, Portugal, 3-8 Setembro 2000. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v.369, n.7-8, p.647-651, 2001.

GARCIA, DE LA C., D.; MAGNAGHI, S.; REICHENBAECHER, M.; DANZER, K. Systematic optimization of the analysis of wine bouquet components by solid-phase microextraction. *Journal of High Resolution Chromatography*, v.19, n.5, p.257-262, 1996.

GARCIA, DE LA C, D.; REICHENBAECHER, M.; DANZER, K.; HURLBECK, C.; BARTZSCH, C.; FELLER, K. H. Investigations on wine bouquet components by solid-phase microextraction-capillary gas chromatography (SPME-CGC) using different fibers *Journal of High Resolution Chromatography*, v.20, n.12, p.665-668, 1997.

GARCIA, DE LA C, D.; REICHENBAECHER, M.; DANZER, K.; HURLBECK, C.; BARTZSCH, C.; FELLER, K. H., Analysis of wine bouquet components using headspace solid-phase microextraction-capillary gas chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography*, v.21, n.7, p.373-377, 1998.

DUCRUET, V.; FOURNIER, N.; SAILLARD, P.; FEIGENBAUM, A.; GUICHARD, E. Influence of packaging on the aroma stability of strawberry syrup during shelf life. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n. 5, p.2290-2297, 2001.

EISERT, R.; LEVSEN, K. SPME coupled to gas chromatography: a new method for the analysis of organics in water. *Journal of Chromatography A*, v.733, n.1-2, p.143-157, 1996.

ENTON, Z. Determining volatiles in beer with automated SPME and GC/MS/ECD. *Chem. N. Z.*, v.62, n.2, p.41-43, 1998.

FERNANDEZ, M.; PADRON, C.; MARCONI, L.; GHINI, S.; COLOMBO, R.; SABATINI, A.G.; GIROTTI, S. Determination of organophosphorus pesticides in honeybees after SPME. *Journal of Chromatography A*, v.922, n.1-2, p. 257-265, 2001.

FERRARI, F., SANUSI, A., MILLET, M., MONTURY, M. Multiresidue method using spme for the Determination of various pesticides with different volatility in confined atmospheres. *Analytical and Bionalytical Chemistry*, v.379, n.3, p.476-483, 2004.

FLAK, W.; TSCHEIK, G. Determination of styrene in wine by solid phase micro extraction technology and GC-MS analysis. *Mitt. Klosterneuburg*, v.47, n.4, p.117-123, 1997.

FREITAS, A. M. C.; PARREIRA, C.; VILAS-BOAS, L. The use of an electronic aroma-sensing device to assess coffee differentiation and comparison with SPME gas chromatography/mass spectrometry aroma patterns. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.14, p. 513-522, 2001.

FRIAS, G. S., SANCHEZ, M.J., RODRIGUEZ, D. M.A. Optimization of a solid-phase microextraction procedure for the determination of herbicides by micellar electrokinetic. *Chromatography Journal of Separation Science*, v.27, n.9,; p.660-666, 2004 .

GALARINI, R.; COSSIGNANI, L.; SIMONETTI, M.S.; RUFFINI, N.; MARCHETTI, C.; LUNEIA, R.; DAMIANI, P. Rapid determination of pesticide residues in honey by SPME-HRGC-NPD and SPME-HRGC-ECD. 1° Assemblea Annuale dei Soci ed Evento Scientifico. Salsomaggiore, Italy, 13 novembre, 1998. *Selezione-Veterinaria*. 2000, Suppl. s417-s422.

GANDINI, N.; RIGUZZI, R. Headspace solid phase microextraction analysis of methyl isothiocyanate in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, n.8, p.3092-3094, 1997.

GORECKI, T.; MINDRUP, R.; PAWLISZYN, J. Pesticides by solid-phases microextraction. results of a robin test. *Analytst*, v.10, n.10, p.1381-1386, 1996.

- GUIDOTTI, M. Determination of Se^{4+} in drinkable water by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, v.83, n.5, p.1082-1085, 2000.
- GUIDOTTI, M.; RAVAIOLI, G. Selective determination of Se^{4+} and Se^{6+} using SPME and GC/MS. *HRC*, v.22, n.7, p.414-416, 1999.
- GUIDOTTI, M.; VITALI, M., Identification of volatile organic compounds present in different honeys through SPME and GC/MS. *Ind. Aliment.*, v.37, n.368, p.351-353, 1998.
- GIUFFRIDA, R.; CLASADONTE, M.T.; ZERBO, A. Determination of benzene and toluene in vegetable oils by SPME/HPLC. *Journal of Commodity Science*, v.38, n.1, p.3-14, 1999.
- HAYASAKA, Y.; BARTOWSKY, E. J. Analysis of diacetyl in wine using solid - phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, n.2, p.612-617, 1999.
- HAWTHORNE, S. B.; MILLER, D. J.; PAWLISZYN, J.; ARTHUR, C. L. Solventless Determination of caffeine in beverages using solid phase microextraction with fused-silica fibers. *Journal of Chromatography*, v.603, p.185, 1992.
- HERNANDEZ, R. A.H., TOVILLA, H. C., MALO, E.A., BELLO. M. R. Organochlorine pesticides water quality and presence of pesticides in a tropical coastal wetland in southern Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, v.48, n.11-12, p.1130-1141, 2004.
- HU, R.; HENNION, B.; URRUTY, L.; MONTURY, M. SPME of pesticide residues from strawberries. *Food Additives and Contaminants*, v.16, n.3, p.111-117, 1999.
- IBANEZ, E.; LOPEZ-SEBASTIAN, S.; RAMOS, E.; TABERA, J.; REGLERO, G. Analysis of volatile fruit components by headspace solid - phase microextraction. *Food Chemistry*, v.63, n.2, p.281-286, 1998.
- JELLEN, H.H.; OBUCHOWSKA, M.; ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R.; WASOWICZ, E. Headspace solid-phase microextraction use for the characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, n.6, p.2360-2367, 2000.
- JELLEN, H.H.; WLAZLY, K.; WASOWICZ, E.; KAMINSKI, E. Solid-Phase Microextraction for the analysis of some alcohols and esters in beer: comparison with static headspace method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, n.4, p.1469-1473, 1998.
- JIA, M.; HE, Y.; FANG, H.; HUANG, J.; ZHOU, S. Study on headspace solid - phase microextraction for determination of chloroform in drinking water. *Huanjing Kexue*, v.19, n.4, p.79-81, 87, 1998a.

JIA, M.; ZHANG, Q. H.; MIN, D. B., Optimization of solid phase microextraction analysis for headspace flavor compounds of Orange Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, p.46, n.7, p.2744-2747, 1998b.

JIMDNEZ, J. J.; BERNAL, J. L.; DEL NOZAL, M. J.; MARTIN, M. T.; MAYORGA, A. L. Solid phase microextraction applied to the analysis of pesticide residues in honey using gas chromatography with electron-capture detection *Journal of Chromatography A*, v. 829, n .1-2, p.269-277, 1998.

JONES, P.R.H.; EWEN, R.J.; RATCLIFFE, N.M. Simple methods for the extraction and identification of amine malodors from spoiled foodstuffs. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.11, n.3, p.274-279, 1998.

JORDAN, M.J.; TILLMAN, N.; MUCCI, B.; LAENCINA, J. Using HS-SPME to determine the effects of reducing insoluble solids on aromatic composition of orange juice. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, v. 34, n. 4, p.244-250, 2001.

JOU, K. D.; HARPER, W. J. Pattern recognition of swiss cheese aroma compounds by SPME/GC and an electronic nose. *Milchwissenschaft*, v.53, n.5, p, 259-263, 1998.

LAY-KEOW, N.G.; HUPE, M.; HARNOIS, J.; MOCCIA, D. Characterization of commercial vodkas by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Journal of Science Food Agricultural*, v.70, n.3, p. 380-388, 1996.

LEE, K.Y.M.; PATERSON A.; BIRKMYRE, L.; PIGGOTT, J.R. Headspace congeners of blended Scotch whiskies of different product categories from SPME analysis. *Journal of the Institute of Brewing*, v.107, n.5, p. 315-332, 2001.

LI, H.P., LI, G.C., JEN, J.F. Determination of organochlorine pesticides in water using microwave assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.1012, n.2, p.129-137, 2003.

LOPEZ, C.C., BOSELLI, E., PIVA, A., NDAGHIJIMANA, M., PAPARELLA, A., SUZZI, G., MASTROCOLA, D. Influence of quinoxifen residues on *saccharomyces cerevisiae* fermentation of grape musts. *Food Technology and Biotechnology*, v.42, n.2, p.89-97, 2004.

LUAN, T.G., LAN, C.Y., ZHOU, H.L., WONG, M.H. Determination of dichlorodiphenyltrichloroethane in water using automated solid phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection Chinese. *Journal of Analytical Chemistry*, v.32, n.4, p.500-502, 2004.

LEHNINGER, A.L. *The molecular basis of cell structure and function* Worth publisher Inc, 12^a edição; New York; 833p., 1990.

LOUCH, D.; MOTLAGH, S.; PAWLISZYN, J. Dynamics of organic compound extraction from water using liquid coated fused silica fibers. *Analytical Chemistry*, v.64, p.1187-1199, 1992.

MAGDIC, S.; BOYD-BOLAND, A.; JINNO, K.; PAWLISZYN, J. Analysis of organophosphorous insecticides from environmental samples by SPME, *Journal of Chromatography A*, v. 736, n.1-2, p. 219-228, 1996.

MAGDIC, S.; PAWLISZYN, J. Analysis of organochlorine pesticides using SPME, *Journal of Chromatography A*, v.723, p.111-122, 1996.

MARSILI, R. T. Comparison of solid - phase microextraction and dynamic headspace methods for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of light-induced lipid oxidation products in milk. *Journal of Chromatography Science*, v.37, n.1, p.17-23, 1999.

MARSILI, R.T. Shelf-life prediction of processed milk by solid-phase microextraction, mass spectrometry, and multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, n.8, p.3470-3475, 2000.

MAZZINI, F.; BARSANTI, C.; SABA, A.; RAFFAELLI, A.; PUCCI, S.; SALVADORI, P. Investigation of olive oil volatile fraction by headspace SPME-GC/MS. *Italian Food and Beverage Technology*, v.21, p.32-34, 2000.

MESTER, M.; BUSTO, O.; GUASCH, J. Headspace solid phase microextraction analysis of volatile sulfides and disulfides in wine aroma. *Journal of Chromatography A*, v.808, n.1-2, p.211-218, 1998.

MESTER, Z.; LAM, J.; STURGEON, R.; PAWLISZYN, J. Determination of methylmercury by solid-phase microextraction inductively coupled plasma mass spectrometry: a new sample introduction method for volatile metal species. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v.15, n.7, p.837-842, 2000.

NAKAI, S.; ZHI, H.W.; NAKAMURA, S.; OGAWA, M.; DOU, J.; OGIHARA, H.; HORIMOTO, Y.; NAKAI, E.; SKURA, B.J. An automated analytical system for quality assurance of foods by applying a new classification method to chromatographic data. *Leatherhead Food RA Food Industry Journal*, v.2, n.4, p.310-323, 1999.

NILSSON, T.; LARSEN, T.O.; MONTANARELLA, L.; MADSEN, J.O. Application of head-space solid-phase microextraction for the analysis of volatile metabolites emitted by *Penicillium* species. *Journal of Microbiological Methods*, v.25, n.3, p.245-255, 1996.

NONATO, E.A.; CARAZZA, F.; SILVA, F.C.; CARVALHO, C.R.; CARDEAL, Z. DE L. A headspace solid-phase microextraction method for the determination of some secondary compounds of Brazilian sugar cane spirits by gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n.8, p.3533-3539, 2001.

OGIHARA, H.; HORIMOTO, Y.; ZHI, H.W.; SKURA, B.J.; NAKAI, S. Solid phase microextraction/gas chromatography of Salmonella-infected beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, n.6, p.2253-2259, 2000.

ONG, P. K. C.; ACREE, T. E. Similarities in the Aroma Chemistry of Gewuerztraminer Variety Wines and Lychee (*Litchi chinesis* Sonn.). *Fruit J. Agric. Food Chem.*, v.47, n.2, p. 665-670, 1999.

PAGE, B.D.; LACROIX, G. Application of SPME to the headspace gas chromatographic analysis of semi volatile organochlorine contaminants in aqueous matrices. *Journal of Chromatography A*, v.757, p.173-182, 1993.

PALMA-HARRIS, C.; MCFEETERS, R.F.; FLEMING, H.P. Solid-phase microextraction (SPME) technique for measurement of generation of fresh cucumber flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n.9, p.4203-4207, 2001.

PAN, L.; ADAMS, M.; PAWLISZYN, J. Determination of fatty acids using solid phase microextraction. *Analytical Chemistry*, v. 67, n.23, p. 4396-403, 1995.

PAWLISZYN, J. *Solid Phase Microextraction – Theory and Practice*. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1997.247p.

POPP, P., BAUER, C., HAUSER, B., KEIL, P., WENNRICH, L. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine compounds from water: a comparison between solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction. *Journal of Separation Science*, v.26, n.9-10, p.961-967, 2003.

POTTER, D.W.; PAWLISZYN, J. Detection of substituted benzenes in water at the pg/mL level using SPME and GC ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, v.625, p. 247-255, 1992.

QUEIROZ, M.E.C.; SILVA, S.M.; CARVALHO, D.; LANÇAS, F.M. Comparison between solid-phase extraction methods for the chromatographic determination of organophosphorus pesticides in water. *Journal of Environmental Science and Health, B (Pesticides, -Food-Contaminants-and-Agricultural-Wastes)*, v.B36, n.5, p.517-527, 2001.

QUINTEIRO, L.M.C.; NOBRE, A.L.R.; FERREIRA, A.B.B.; GODOY, R.L.O.; CASTRO, I.M. Micro-extração em fase sólida: fundamentos e aplicações em análise de alimentos. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v.21, n.1, p.1-30, 2003

ROHRIG, L.; MEISCH, H.U. Application of SPME for the rapid analysis of chlorinated organics in breast milk. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v. 366, n.1, p.106-111, 2000.

RUIZ, J.; CAVA, R.; VENTANAS, J.; JENSEN, M. T. Headspace solid phase microextraction for the analysis of volatiles in a meat product: dry-cured Iberian ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, n.11, p.4688-4694, 1998.

SAKAMOTO, M., TSUTSUMI, T. Applicability of headspace solid-phase microextraction to the Determination of multi-class pesticides in waters. *Journal of Chromatography A*, v.1028, n.1, p.63-74, 2004.

SERVILI, M.; SELVAGGINI, R.; BEGLIOMINI, A. L.; MONTEDORO, G. F. Effect of thermal treatment in the headspace volatile compounds of tomato juice. *Dev. Food Sci.* v. 40, p.315-330, 1998.

SERVILI, M.; SELVAGGINI, R.; TATICCHI, A.; BEGLIOMINI, A.L.; Montedoro, G. Relationships between the volatile compounds evaluated by solid phase microextraction and the thermal treatment of tomato juice: optimization of the blanching parameters. *Food-Chemistry*, v.71 (3, Cost action 96: food and flavour), p.407-415, 2000.

SHU, Y.Y., WANG, S.S., TARDIF, M., HUANG, Y.P. Analysis of polychlorinated biphenyls in aqueous samples by microwave-assisted headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, v.1008, n.1,; p.1-12, 2003.

SIDES, A.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; MIN, A. Changes in the volatile profile of oats induced by processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n.5, p.2125-2130, 2001.

SONG, JUN; FAN, LIHUA; BEAUDRY, RANDOLPH M. Application of solid phase microextraction and gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for rapid analysis of flavor volatiles in tomato and strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, n.9, p.3721-3726, 1998.

SOUZA, D.A., LANÇAS, F.M. Solventless sample preparation for pesticides analysis in environmental water samples using solid-phase microextraction-high resolution gas chromatography/mass spectrometry (SPME-HRGC/MS). *Journal of Environmental Science and Health Part b-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, v.38, n.4, p.417-428, 2003.

SUN, T.H., JIA, J.P., FANG, N.H., WANG, YL., YU, J. Analysis of organochlorine pesticides in water by novel activated carbon fiber-solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health Part b-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, v.39, n.2, p.235-248, 2003

TOMAINO, R.M.; PARKER, J.D.; LARICK, D.K. Analysis of free fatty acids in whey products by solid-phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n.8, p.3993-3998, 2001.

VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F. Micro-extração por fase sólida. *Química Nova*, v.23, n.4, p.523-530, 2000.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F.; MONTERO, L.; DA ROCHA, E. C.; PAWLISZYN, J. Application of SPME (solid phase micro-extraction) to the analysis of potable water from three locations in the state of Sao Paulo. *Química Nova*, v. 21, n.6, p.804-806, 1998.

VAS, G. Characterization of beer samples using SPME/ capillary GC analysis. *Supelco Reporter*, v.16, n.4, p.7,1997.

VAS, G. Y.; KOTELEKY, K.; FARKAS, M.; DOBO, A.; VEKEY, K. Fast screening method for wine headspace compounds using solid - phase microextraction (SPME) and capillary GC technique. *Am. J. Enol. Vitic.* v.49, n.1, p.100-104,1998.

VAZ, J.M., KOMATSU, E. Fast screening Determination of some ubiquitous pesticides with spme in water samples. *Analytical Letters*, v.37, n.7, p.1427-1436, 2004.

VERGNAIS, L.; MASSON, F.; MONTEL, M.C.; BERDAGUE, J.L.; TALON, R. Evaluation of solid-phase microextraction for analysis of volatile metabolites produced by staphylococci. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, n.1, p.228-234, 1998.

VIANNA, E.; EBELER, S.E. Monitoring ester formation in grape juice fermentations using solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n.2, p.589-595, 2001.

VITALI, M.; GUIDOTTI, M.; GIOVINAZZO, R.; CEDRONE, O. Determination of pesticide residues in wine by SPME and GC/MS for consumer risk assessment. *Food Additives and Contaminants*, v.15, n.3, p.280-287, 1998.

VOLANTE, M.; CATTANEO, M.; BIANCHI, M.; ZOCCOLA, G. Some applications of solid phase micro extraction (SPME) in the analysis of pesticide residues in food. *Journal of Environmental Science and Health B (Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes)*, v.B33 , n.3, p.79-292, 1998

VOLANTE, M.; GALARINI, R.; MIANO, V.; CATTANEO, M.; PECORELLI, I.; BIANCHI, M.; MARINONI, M.T.; COSSIGNANI, I.; DAMIANI, P. A SPME-GC-MS approach for antivarroa and pesticide residues analysis in honey. *Chromatographia*, v.54, n.3-4, p.241-246, 2001.

WADA, S.A.D. Lipid analysis of PUFA in the new millennium and future trends. *Japan Journal of Oleo Science*, v.50, n.5, p.329-338, 2001.

WENNRICH, L.; POPP, B. B. Determination of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in fruit and vegetables using subcritical water extraction combined with sorptive enrichment and CGC-MS. *Journal of Chromatography*, v.53, n.S380-S386, Part 2, Suppl. S, 2001.

WENNRICH, L.; POPP, B. B.; KOLLER, G.; BREUSTE, J. Determination of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in strawberries by using accelerated solvent extraction combined with sorptive enrichment and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, v.84, n.4, p.1194-1201,2001.

WHITON, R.S.; ZOECKLEIN, B.W. Optimization of headspace solid phase microextraction for analysis of wine aroma compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.51, n.4, p.379-382, 2000.

WYLLIE, S.G.; FELLMAN, J.K. Formation of volatile branched chain esters in bananas (*Musa sapientum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, n.8, p.3493-3496, 2000.

XUETONG, F.; GATES, R.A. Degradation of monoterpenes in orange juice by gamma radiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n.5, p.2422-2426, 2001.

YANG, M.J.; ORTON, M. L.; PAWLISZYN, J. Quantitative determination of caffeine in beverages using a combined SPME-GC/MS method. *Journal of Chemical Education*, v.74, n.9, p.1130-1132, 1997.

YU, J.X., WU, C.Y., XING, J. Development of new solid-phase microextraction fibers by sol-gel technology for the determination of organophosphorus pesticide multiresidues in food. *Journal of Chromatography A*, v.1036, n.2, p.101-111, 2004.

ZARNBONIN, C.G., QUINTO, M. D.E., VIETRO, N., PALMISANO, F. Solid-phase microextraction - gas Chromatography mass spectrometry: a fast and simple screening method for the assessment of organophosphorus pesticides residues in wine and fruit juices. *Food Chemistry*, v.86, n.2, p.269-274, 2004.

ZARNBONIN, C.G.; MONACI, L.; ARESTA, A. Determination of cyclopiazonic acid in cheese samples using solid-phase microextraction and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, v.75, n.2, p. 249-254, 2001.

ZHANG, Z.; PAWLISZYN, J. Headspace SPME. *Analytical Chemistry*, v.65, p. 1843-1852, 1993.

CAPÍTULO III

OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS QUE AFETAM A EFICIÊNCIA DA MICRO-EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos, a MEFS tem sido aplicada para determinação de uma variedade de analitos em vários tipos de amostras de água. Os compostos investigados incluem, geralmente, grupos de compostos orgânicos voláteis de baixa polaridade, derivados do petróleo, BTEX (benzeno, tolueno, etil benzeno e xilenos), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) ou compostos organometálicos. Mais recentemente a MEFS tem sido também aplicada na determinação de agrotóxicos em matrizes aquosas incluindo organoclorados (AOC), organofosforados e triazinas, mas a maioria é analisada por MEFS no *headspace* (QUINTEIRO *et al.*, 2003).

Trabalhos sobre aplicações de MEFS para a determinação de agrotóxicos em amostras de alimentos, como sucos, vinhos, frutas, foram encontrados na literatura em pequeno número e nenhum em hortaliças.

Os métodos rotineiros para análise dos resíduos de agrotóxicos freqüentemente consomem reagentes e tempo, devido às fases de preparação da amostra antes da análise cromatográfica. Além do mais, concentrações muito baixas não são captadas pelos métodos convencionais e a tendência de controle analítico de AOC em vários tipos de amostras de águas e de alimentos é ser intensiva e não parar.

A importância da determinação dos AOC não deve ser esquecida, pois, mesmo sendo proibidos, ou, com usos restritos na maioria dos países, tratam-se de compostos de difícil degradação e de alta persistência. Em geral, a toxicidade destes pesticidas em ambientes naturais, em animais e no homem é bastante elevada, mesmo em baixas concentrações. Matrizes contaminadas por estes compostos em concentrações na ordem de décimos de mg/mL já constituem um alerta, devido à sua alta capacidade de bioacumulação e deslocamento no meio ambiente. Por outro lado, muitas amostras poderão apresentar resíduos de agrotóxicos com concentrações abaixo do limite de quantificação (ou até mesmo de detecção) pelos métodos correntes disponíveis de análise. Para determinação de tão baixas concentrações faz-se necessário o uso de métodos analíticos que sejam suficientemente sensíveis.

Já que vários trabalhos mostram a eficiência do método MEFS/CG na análise de agrotóxicos em concentrações da ordem de $\mu\text{g/mL}$ e até de ng/mL , ele poderia ser usado com maior freqüência e legitimado como oficial. A presença de agrotóxicos, de uma maneira geral, não pode deixar de ser monitorada para garantir a sua aplicação segura e melhor proteger a saúde humana e animal e reduzir impactos ambientais.

Como mencionado no **Capítulo II** a Micro-extração em Fase Sólida (MEFS) consiste em colocar a amostra com uma fibra de sílica fundida revestida com um material adsorvente (polímero). A amostra é colocada em um frasco fechado, o septo é perfurado, o material adsorvente é exposto à amostra durante um período de tempo que geralmente

oscila entre 15 e 30 minutos, para que os analitos sejam adsorvidos. Após esta fase, a seringa é retirada do frasco sendo, a seguir, inserida no septo do injetor de um cromatógrafo gasoso (CGAR) onde é exposta à temperatura selecionada. Nesta fase os analitos são adsorvidos do material polimérico dentro do injetor para, em seguida, sofrerem análise. A dessorção é total e a fibra é re-utilizável, com uma vida útil de mais de 50 injeções.

A MEFS é uma técnica de equilíbrio e para um bom desempenho é necessário que as extrações sejam cuidadosamente controladas, com os parâmetros físico-químicos, instrumentais e analíticos bem definidos. Cada componente se comportará diferentemente, dependendo da polaridade, volatilidade, coeficiente de partição, do volume de amostra e/ou do *headspace*, da velocidade de agitação, da composição da matriz, do pH e da temperatura (PAWLISZYN, 1997).

O conhecimento das teorias analítica e físico-química que fundamentam a técnica MEFS orienta, de forma clara e objetiva, procedimentos para o estabelecimento de parâmetros que governam a sua eficácia. Tais procedimentos devem ser realizados com muito critério e as respostas obtidas numa etapa ajudam a delinear a próxima.

Devido ao sucesso da MEFS como um método para determinação quantitativa de inseticidas organofosforados em águas e em alimentos, o presente estudo foi executado como uma tentativa de unir o modo de extrair por MEFS, por imersão direta, com o método de separação e análise por CGAR/DCE, para a determinação simultânea de seis AOC: Lindano, Aldrin, DDE, Dieldrin, TDE e Mirex, em amostras de água e alfaces.

1.2 OBJETIVO

Otimizar os principais parâmetros que governam a eficiência da técnica MEFS, enfocando os seguintes principais pontos:

- Tempo de dessorção
- Velocidade de Extração
- Tempo de Extração
- Efeito da matriz

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 EQUIPAMENTOS

- Balança de precisão ($\pm 0,001\text{g}$), modelo E02140 – Ohaus.
- Balança de precisão ($\pm 0,001\text{g}$), modelo E02140 – Ohaus.
- Placa agitadora, 600 a 1.200 rpm, modelo PC 420 – Corning.
- Purificador de água Milli-Q, modelo Gradiente A-10 – Millipore.
- Ultra-som, modelo t 25 basic – Labortechnik.
- Homogeneizador Ika Labortechnik modelo t 25 basic – Ika Labortechnik.
- Capela de exaustão de gases.
- Cromatógrafo gasoso de alta resolução (CGAR) com detector de captura de elétrons (DCE), modelo Trace GC série 2000, com sistema de aquisição ChromCard – Termoquest, CE Instruments. Coluna capilar com fase 5% de difenil 95% dimetilsiloxano - DB-5 (29m x 0,25mm de diâmetro interno, com espessura do filme de 0,25 μm), modelo 122-5032 – J&W Scientific.

2.1.2 ACESSÓRIOS ESPECÍFICOS PARA MEFS

- Amostrador manual para a MEFS – Supelco.
- Fibra revestida com PDMS com espessura de 100 μm (PDMS-100) - Supelco.
- Frascos de vidro incolor de 30 mL com tampa contendo septo de Teflon – Supelco.

2.1.3 VIDRARIAS E OUTROS ACESSÓRIOS DE LABORATÓRIO

- Espátula inoxidável.
- Indicador de pH 0-14 – Merck.
- Balões volumétricos, provetas e bécheres com capacidades variadas.
- Cronômetro Digital – VWR Control CO.
- Papel de filtro de filtração rápida – J. Prolab JP 41.
- Barra magnética de agitação de Teflon formato oval – Supelco.
- Micro-seringa para injeção de CG, capacidade 10 μL , Hamilton.
- Micropipetas de 20 a 200 μL , de 0,1 a 1 mL e de 1 a 5 mL – Finnpiquette.
- Papel de filtro de filtração lenta (faixa azul) Blue Rib 589 – Schlecher & Schuell.

2.1.4 REAGENTES, SOLVENTES E GASES

- Padrões de agrotóxicos e purezas – Polyscience (USA): Lindano (97%), Aldrin (97,8%), DDE (97%), Dieldrin (97%), TDE (99%), Mirex (97%).
 - Água ultrapura obtida do sistema de purificação Milli-Q.
 - NaCl P.A – Vetec.
 - Metanol grau pesticida (*) – Merck.
 - Extran alcalino – Merck.
 - Acetona P.A.
 - HCl P.A – Quimex.
 - NaOH P.A. – Vetec.
 - Gás Hélio específico para DCE – White Martins.
 - Gás Nitrogênio específico para DCE – White Martins.
- (*) Grau pesticida significa teor controlado de espécies que dão respostas no detector de captura de elétrons (DCE), ao nível de parte ng/L (ppt).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 TRATAMENTO DOS MATERIAIS NÃO DESCARTÁVEIS

Pré-lavagem

- a) Todas as vidrarias e acessórios foram transportados para a capela de exaustão de gases e lavada com acetona, a fim de carrear qualquer resíduo orgânico para o frasco-coletor de descartes, evitando contaminação na rede de esgoto.
- b) Em seguida, este material foi lavado com sapólio e água corrente, utilizando-se escovas para ajudar na remoção de impurezas.

Lavagem

- a) Todo o material pré-lavado foi deixado de molho, por 1h, em recipiente contendo solução com água e detergente neutro, Extran[®], em proporção de 1:20.
- b) Após a etapa anterior o material foi enxaguado em água corrente, para que qualquer vestígio de sabão fosse retirado.
- c) Toda a vidraria foi, finalmente, lavada com água destilada.

Rinsagem

- a) Todo o material limpo foi lavado com acetona e depois com metanol, sempre recolhendo os solventes em frasco-coletor próprio.
- b) Após a secagem, todo o material foi embalado com folhas de alumínio.

2.2.2 PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES PADRÃO DE AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS (LINDANO; ALDRIN; DIELDRIN; TDE; MIREX; DDE):

a) Soluções padrão estoques individuais: foram preparadas, para cada agrotóxico, duas soluções padrão estoques individuais. Uma com concentração a 1 mg/mL (10 mg do agrotóxico para 10,00 mL de volume final) e outra a 0,01 mg/mL (através de diluição 1:100 da primeira, para cada agrotóxico). Todas as 12 soluções foram estocadas a -4°C.

b) Soluções padrão de trabalho mistas: soluções padrão de trabalho mistas a 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 e 1 µg/mL (concentração de cada analito), foram preparadas a partir da mistura de alíquotas das soluções (0,01 mg/mL) preparadas no item anterior. As alíquotas variaram de 0,1 a 1,00 mL para um volume total de 10,00 mL e subsequente diluição em metanol. Estas seis soluções foram estocadas a -4°C.

2.2.3 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA OTIMIZAÇÃO DA MEFS

a) Amostras de água fortificadas a 10 ng/mL com agrotóxicos organoclorados (solução-amostra 1)

Obtenção das amostras: as amostras de água ultrapura foram, diariamente, obtidas a partir da passagem de água destilada no sistema de purificação especificado no **item 2.1.4**, sendo, em seguida, utilizada para a preparação da **solução-amostra 1**.

Preparação da solução-amostra 1: após transferência de 15,00 mL de água ultrapura para o frasco de extração, uma alíquota de 150 µL de solução padrão mista de trabalho (**item 2.2.2.b**) foi adicionada, finalizando fortificações a 10 ng/mL.

b) Amostras de extrato aquoso de alface fortificado a 10 ng/mL com agrotóxicos organoclorados (solução-amostra 2)

Obtenção da amostra: Uma amostra de alface foi adquirida a partir de cultivo em terreno particular, localizado em Ponta Negra, Maricá, RJ, sem adição de agrotóxicos, para ser utilizada exclusivamente nos estudos de otimização e validação da MEFS para os organoclorados de Lindano, Aldrin, Dieldrin, DDE, TDE e Mirex na amostra fortificada. Depois de coletada, foi embalada e conservada sob refrigeração até o momento do uso sob a forma de extrato aquoso fortificado (**solução-amostra 2**).

Preparação da solução-amostra 2: 1 g (\pm 0,0001 g) de amostra de alface, sem lavagem prévia, foi triturada em homogeneizador com cerca de 20 mL de água ultrapura, transferida para balão volumétrico de 50,00 mL, completando-se o volume com água ultrapura. Após, foi filtrado em papel de filtro quantitativo lento. Após transferência de

15,00 mL do filtrado (extrato aquoso de alface) para o frasco de extração, foi adicionada uma alíquota de 150 µL da solução padrão mista de trabalho (**item 2.2.2.b**), finalizando fortificações a 10 ng/mL.

2.2.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR/DCE) com especificações e acessórios anteriormente descritos em equipamentos (**item 2.2.1**). A programação da temperatura do forno do CGAR encontra-se na **Tabela 9**.

Tabela 9 Programação da temperatura do forno usada para análise dos organoclorados em CGAR/DCE

RAMPAS	RAZÃO (°C/min)	T (°C)	TEMPO (*) (min)
Inicial	-	50	5
1	50	210	0
2	0,5	215	1
3	20	290	5

(*) Tempo de residência da temperatura T°C programada para o forno (*Hold time*).

O gás carreador (hélio) foi mantido a uma velocidade de fluxo constante de 0,5 mL/min e o gás *make-up* (nitrogênio) a uma velocidade de fluxo de 30 mL/min. A temperatura do DCE foi mantida a 250°C (base) e 300°C (corpo). O injetor foi aquecido a 250°C e com fluxo de gás carreador hélio (*splitflow*) de 50 mL/min, no modo *splitless* em tempo variado: para injeção convencional foi fixado em 0,8 min e para o experimento com a MEFS os tempos usados variaram de 1 a 8 min, de acordo com o experimento.

2.2.5 CONDICIONAMENTO DA FIBRA PDMS-100

O condicionamento da fibra PDMS-100 foi realizado no injetor do CGAR com temperatura de 250°C, por 1 hora, de acordo com o manual de instrução do fabricante da fibra (SUPELCO, 2003).

2.2.6 DETERMINAÇÃO DOS VOLUMES MOLARES DOS AGROTÓXICOS

O cálculo do volume molar de cada agrotóxico foi realizado com o programa Chem 3D Ultra.

2.2.7 TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS DOS DADOS

A comparação dos resultados foi realizada ao nível de 95% de confiança, pelas análises de variâncias e pelo teste t de Student, através do programa contido no MicroCal Origin.

As médias, os desvios-padrão, as curvas analíticas e as regressões lineares foram calculadas pelo mesmo programa estatístico MicroCal Origin.

Os gráficos de barra foram construídos com auxílio do Microsoft Excel.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2 ESTUDO DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS PARA A OTIMIZAÇÃO DA MEFS EM AMOSTRAS DE ÁGUA E DE ALFACE

3.2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS PARA OS PROCEDIMENTOS PRELIMINARES DE OTIMIZAÇÃO

Vários procedimentos preliminares foram realizados considerando-se determinadas etapas da extração e suas particularidades, para que o estudo da otimização seja realizado com um bom desempenho. Os resultados são discutidos a seguir.

a. Seleção da Fibra

A seleção da fibra foi realizada através de uma extensa pesquisa bibliográfica sobre o assunto. Com estes dados, ficou constatada que a seleção da melhor fibra para ser usada na MEFS depende da natureza do analito. Dela vai depender a afinidade que o analito tem pela fibra e cuja grandeza é expressa pelo coeficiente de partição ou coeficiente de distribuição fibra/água ($K_{F/A}$) (BOYD-BOLAND, 1996). Esta propriedade é um parâmetro que indica a seletividade da fibra revestida com relação ao analito e à interação do mesmo com a matriz. Em condições ótimas de análise por MEFS, a quantidade de analito é diretamente proporcional à $K_{F/A}$ (ARMON, 1997; ARTHUR & PAWLISZYN, 1990; LOUCH *et al.*, 1992; PAWLISZYN, 1997). Caso o $K_{F/A}$ do analito não seja disponível na literatura, ele pode ser determinado experimentalmente, após estabelecimento do equilíbrio

de adsorção, ou estimado, rapidamente, através de seu coeficiente de partição octanol/água ($K_{O/A}$). Encontrado facilmente na literatura (DEAN *et al*, 1996), $K_{O/A}$ é útil para prever a afinidade de compostos orgânicos por determinados polímeros apolares, como o polidimetilsiloxano (PDMS), por exemplo (EISERT & LEVSEN, 1996).

O uso de uma fibra que proporciona um valor máximo de $K_{F/A}$ irá produzir um máximo na sensibilidade, e os limites de detecção (L.D.) tenderão a um valor mínimo. Dugay e colaboradores (1998) frisaram que, devido a esta dependência, a escolha da fibra se torna um procedimento muito importante. E, confirmou o que já foi anteriormente colocado, que a PDMS, por ser apolar, é a preferida para extrações de analitos lipossolúveis como é o caso dos organoclorados.

Hong-Ping e colaboradores (2003), em determinações de agrotóxicos organoclorados por MEFS, observaram um bom desempenho para a fibra PDMS, que será a usada em todos os experimentos aqui estudados

Para o presente trabalho, a espessura de 100 μm foi a escolhida, pois, segundo a literatura, oferece maior resistência e versatilidade, servindo tanto para analitos voláteis como não voláteis, proporcionando bons resultados com agrotóxicos. De acordo com Valente e Augusto (2000) esta espessura de 100 μm equivale dizer que a fase estacionária possui um volume (V_F) de aproximadamente 0,7 μL . Segundo Pawliszyn (1997), fibras com camadas mais espessas de polímero são as que possuem um volume maior de material extrator e por isto são as que têm capacidade de adsorver maiores quantidades de analitos em um determinado tempo de extração. Deste modo, a fibra PDMS com espessura de 100 μm foi a selecionada para realizar este trabalho.

b. Condicionamento da fibra PDMS-100 – Monitoramento

Neste experimento ficou constatado que a fibra, ao ser usada pela primeira vez, necessita de ser condicionada termicamente. O condicionamento da fibra foi essencial para a ativação dos pontos de adsorção, expulsando qualquer impureza e/ou contaminante que possam estar presentes, contribuindo para o bom desempenho da MEFS.

Segundo o manual do fabricante de instrumentos e acessórios para MEFS, Supelco (2003), é comum que nas duas primeiras dessorções as fibras liberem monômeros da cola usada na sua montagem, resultando no surgimento de picos estranhos.

O condicionamento foi realizado termicamente por 1 hora no injetor a 250⁰C (SUPELCO, 2003).

Para facilitar e complementar este processo verificou-se que é aconselhável também lavar a fibra em água ultrapura sob imersão por 10 minutos, com agitação.

Para verificar o resultado destas operações foi realizada uma corrida-branco, com tempo de dessorção igual a 5 minutos, a 250⁰C no injetor do CG, com válvula do *split*

fechada (*splitless*) também por 5 min, seguindo a programação apresentada no item (2.2.4). O condicionamento da fibra foi considerado completado quando o cromatograma se apresentava limpo. Foi necessário condicionar a fibra duas vezes.

O resultado obtido a partir da corrida do branco, após o condicionamento da fibra PDMS-100, obtido neste experimento é apresentado na **Figura 9**.

Mesmo após o condicionamento da fibra, alguns picos (**Figura 9**) surgiram devido às impurezas ainda presentes, provavelmente, derivadas do processo de fabricação. A operação – dessorção térmica seguida de avaliação da corrida-branco – foi realizada três vezes até a obtenção de um cromatograma limpo. Na última operação, com intuito de garantir maior limpeza, a fibra ficou imersa por 10 minutos, em água ultrapura sob agitação, sendo em seguida, levada para dessorção. O resultado desta operação é apresentado na **Figura 10**.

Após estes tratamentos, observou-se (**Figura 10**) que a fibra revestida estava pronta para ser utilizada com segurança, pois os picos indesejáveis desapareceram.

Pode-se concluir que a realização desta etapa é essencial para a retirada de impurezas que possam interferir na otimização e nos resultados finais de análises de amostras reais.

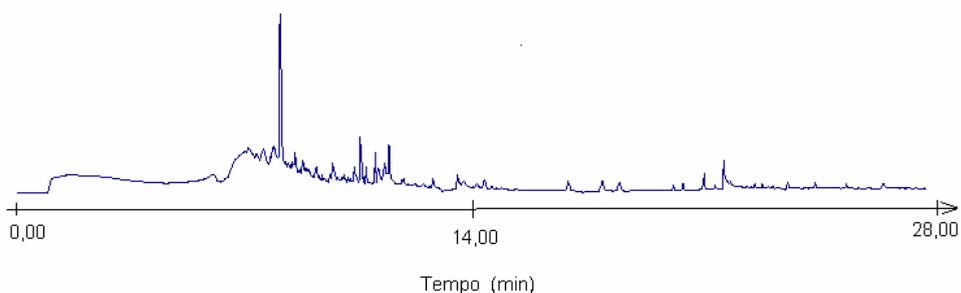


Figura 9 Cromatograma após corrida-branco do primeiro condicionamento da fibra; $t_D = 5$ min a 250°C

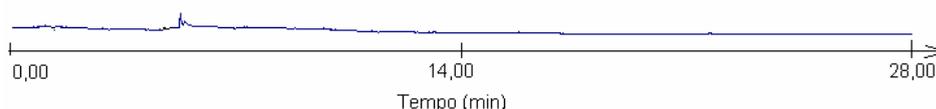


Figura 10 Cromatograma após corrida-branco do último condicionamento da fibra; $t_D = 5$ min a 250°C

c. Efeito memória - Monitoramento

O efeito memória se deve a dessorção incompleta com acúmulo de analitos e impurezas que podem estar presentes na fibra devido às contaminações das soluções-padrão, pipetas, da água ultrapura ou das amostras. Então, para assegurar que a dessorção era completa, e que não deixava resíduos para a próxima extração, sempre foi realizada uma corrida-branco conforme item anterior (**item b**) após cada três micro-extrações. E, como prática de rotina, após cada micro-extração, a fibra era lavada com água ultrapura, sob agitação por 10 minutos, para assegurar completa remoção dos agrotóxicos.

Com esses procedimentos foi possível verificar também que a água obtida pelo sistema de purificação Milli-Q e o metanol, não continham impurezas detectáveis.

d. Estudo do posicionamento da fibra na zona aquecida do injetor

A fibra pode ser regulada para ser exposta nos comprimentos de 1, 2, 3 e 4 cm, de acordo com o comprimento do *liner* do cromatógrafo (no caso, 10 cm de comprimento).

Para o estudo da influência do posicionamento (profundidade) da fibra no injetor, no *liner*, sobre a dessorção dos analitos utilizou-se a **solução-amostra 1** (água fortificada a 10 ng/mL , preparada no **item 2.2.3.a**). Nela, a fibra foi imersa por 15 minutos sob agitação a 1.200 rpm . Após este tempo, a fibra foi retraída e retirada da solução, sendo inserida no CGAR, nas condições programadas especificadas no **item 2.2.4**, com um tempo de dessorção constante de 8 minutos (mantendo o injetor a 250°C , no modo *splitless* por este mesmo tempo).

Para concentrações ppb, como a usada no teste (10 ng/mL), intencionalmente baixa, foi necessário determinar o posicionamento da fibra no *liner*, em vários comprimentos. Nos comprimentos 1 e 2 cm nenhum pico foi detectado e no de 3 cm alguns picos surgiram, mas com baixa resolução. Somente com o comprimento máximo de 4 cm, houve detecção dos sinais analíticos, com resolução adequada, para todos os agrotóxicos estudados.

e. Verificação dos tempos de retenção (t_R) e reprodutibilidade dos agrotóxicos estudados

Valores de t_R obtidos com injeção convencional

Os tempos de retenção dos analitos foram determinados injetando-se alíquotas de 1,8 μ L de soluções padrão individuais e mista de trabalho a 0,4 μ g/mL (N=3) no CGAR. Em uma primeira fase, todos os agrotóxicos foram injetados separadamente e, em outra, foram injetados em uma única solução, não ocorrendo influência entre os mesmos, quanto aos tempos de retenção, quando misturados.

A identificação dos compostos na solução mista foi realizada através da comparação dos tempos de retenção obtidos entre as soluções-padrão, individualmente injetadas, e também através de co-injeções. As condições CGAR/DCE utilizadas estão indicadas no **item 2.2.4**.

O cromatograma resultante, de uma das injeções, pode ser observado na **Figura 11** e os valores médios dos tempos de retenção (t_R), com os respectivos coeficientes de variação (%CV), para cada agrotóxico, podem ser observados na **Tabela 10**.

No cromatograma da Figura 11 pode ser observado que os tempos de retenção de cada agrotóxico permitiram uma boa separação, o que é importante como parâmetro para análise.

Na Tabela 10 observa-se que os valores obtidos de CV (%) mostram uma repetitividade adequada nos tempos de retenção, com um valor mínimo de 1,56% para o TDE e um máximo de 3,71% para o Lindano. Uma baixa variação no tempo de retenção, como ocorrido neste experimento, é importante, pois além de sinalizar adequado procedimento de injeção pelo operador (injeta do mesmo modo) e funcionamento do método, no caso CGAR/DCE, também contribui com o processo de identificação do analito.

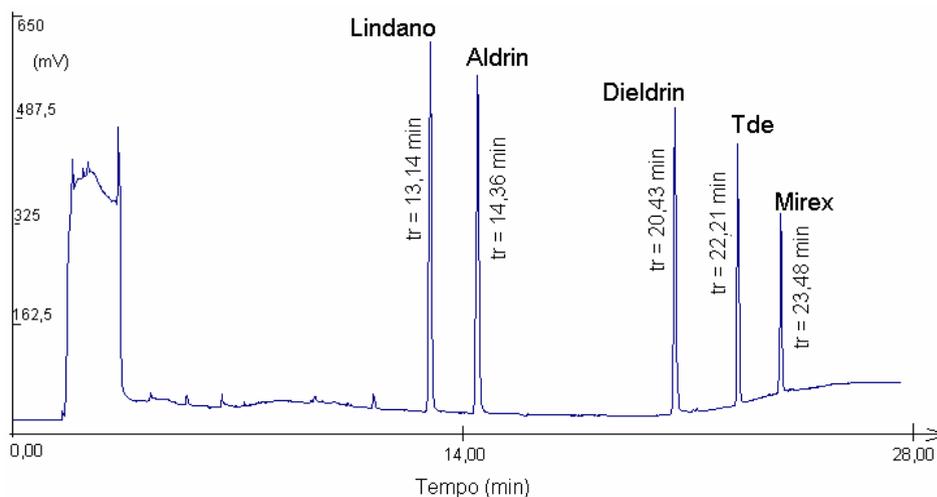


Figura 11 Cromatograma obtido a partir da injeção de 1,8 μL de solução padrão metanólica mista a 0,5 $\mu\text{g/mL}$

Tabela 10 Médias ($N = 3$) dos tempos de retenção (t_R) e respectivos coeficientes de variação obtidos para cada agrotóxico vs injeção convencional

AGROTÓXICO	t_R (min)	% CV
Lindano	13,14	3,71
Aldrin	14,36	1,58
Dieldrin	20,43	2,53
TDE	22,21	1,56
Mirex	23,48	1,81

Valores de t_R obtidos por MEFS

Para efeito de comparação, os tempos de retenção (t_R) de cada agrotóxico extraído ($N = 3$) por MEFS também foram determinados. Para isto utilizou-se o modo de extração por imersão direta (ID) com tempo de extração (t_E) de 15 min, sob agitação, 1.200 rpm, na **solução-amostra 1** (água fortificada a 10 ng/mL, preparada no **item 2.2.3.a**). O tempo de dessorção (t_D) foi de 60 s a 250°C, em *splitless* também por 60 s, nas condições cromatográficas CGAR/DCE indicadas no **item 2.2.4**.

Os valores do tempo de retenção para cada agrotóxico podem ser observados na **Tabela 11**, mostrando a ocorrência de coeficientes de variação relativamente baixos, na faixa de 0,5% a 1,5% para o Dieldrin e para o Aldrin, respectivamente.

Comparando os coeficientes de variação dos t_R obtidos via injeção convencional e por MEFS, pode-se observar que menores variações foram encontradas na micro-extração, apesar da concentração da solução analisada neste caso ser 40 vezes menor. Este fato é altamente favorável para o estabelecimento do método MEFS-ID/CGAR/DCE. Para a detecção de resíduos de agrotóxicos, tem-se a necessidade de dispor de métodos que tenham limites de detecção em décimos de ppm, ppb e até de ppt. Na **Figura 12** pode ser observado o cromatograma obtido.

Tabela 11 Médias (N = 3) dos tempos de retenção (t_R) e respectivos coeficientes de variação obtidos para cada agrotóxicos *vs* MEFS-ID/CGAR/DCE, em amostra de água fortificada a 10 ng/mL

AGROTÓXICO	t_R (min)	% CV
Lindano	13,20	1,0
Aldrin	16,80	1,5
Dieldrin	21,20	0,5
TDE	22,00	0,7
Mirex	24,00	0,6

Comparando os cromatogramas (convencional e MEFS), **Figuras 11 e 12**, pode-se observar que apesar da solução analisada por MEFS ser mais diluída (40 vezes), as áreas não foram tão menores o que comprova que esta técnica extrai e concentra os analitos ao mesmo tempo, o que é um fator favorável. A concentração, que nos métodos convencionais é uma etapa obrigatória, é uma das fontes de perda de analitos por volatilização ou decomposição térmica, sendo freqüentemente demorada.

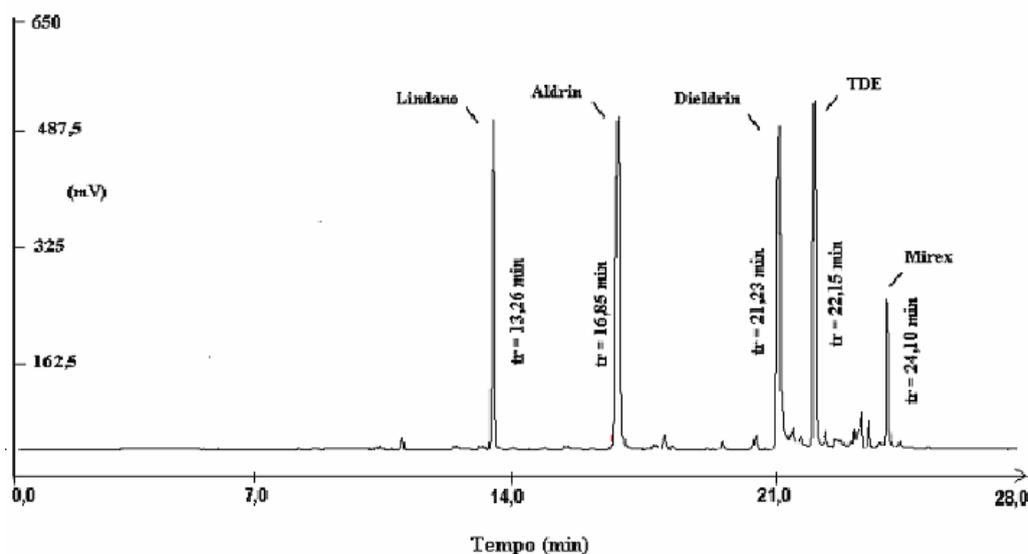


Figura 12 Cromatograma de análise por MEFS-ID/CGAR/DCE de agrotóxicos na solução-amostra de água fortificada (10 ng/mL) com extração por PDMS-100 sob agitação a 1.200 rpm com $t_E = 15$ min em $t_D = 60$ s

O cromatograma representado na **Figura 12** mostra uma linha de base com boa estabilidade, boa resolução e sem picos interferentes. E, em comparação com o cromatograma anterior (injeção convencional) pode ser notado que a linha de base do cromatograma por MEFS apresentou-se mais constante. Mais uma vez, os resultados indicam que a extração proposta é adequada para a determinação dos analitos de interesse, em concentrações de ppb.

f. Coeficiente de Correlação (r) e repetitividade da sensibilidade

Para verificação do funcionamento do detector e do comportamento dos agrotóxicos, foram realizados estudos sobre a repetitividade dos sinais analíticos, foram realizadas três curvas de calibração injetando-se alíquotas de 1,8 μ L de soluções padrão metanólicas mistas de trabalho na faixa de 0,1 a 0,8 μ g/mL. As médias das curvas de calibração e os coeficientes de variação (%CV) para a sensibilidade (coeficiente angular) das mesmas, para cada agrotóxico, encontram-se na **Tabela 12**.

Os coeficientes de correlação (r) foram calculados a partir dos 15 dados (triplicata em cinco pontos) da curva de calibração e variou entre 0,9987 e 0,999, como mostrado na **Tabela 12**.

Tabela 12 Médias (N=3) das curvas de calibração e respectivos coeficientes de correlação (r) e coeficientes de variação (%) para a sensibilidade da curva de cada analito nas concentrações de 0,1 – 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 µg/mL, em metanol.

AGROTÓXICO	CURVA ANALÍTICA $Y = ax + b$	r	%CV da SENSIBILIDADE
Lindano	$y = 1,71 E06 x + 1,20 E05$	0,9987	0,41
Aldrin	$y = 1,73 E06 x + 6,61 E04$	0,9997	0,82
Dieldrin	$y = 1,37 E06 x + 2,89 E04$	0,9999	2,59
TDE	$y = 8,54 E05 x + 2,11 E04$	0,9999	0,91
Mírex	$y = 6,27 E05 x + 2,51 E03$	0,9997	0,11

$y = \text{área}$; $a = \text{coeficiente angular}$; $x = \text{concentração em ng/mL}$; $b = \text{coeficiente linear}$

Os resultados mostram excelente correlação entre a variação dos sinais detectados e a variação da concentração, com coeficientes de variação que não ultrapassaram a 3%. Isto é importante para a quantificação, pois grandes variações na sensibilidade e baixas correlações indicam falta de ajuste no método e/ou no equipamento.

Os dados referentes a curva de calibração para a MEFS encontram-se mais adiante após a otimização, na validação do método (Capítulo IV).

g. Diluição de matrizes complexas

Para a aplicação da MEFS por imersão direta na solução-amostra (MEFS-ID), foi necessário realizar testes para estabelecer a diluição da amostra durante o preparo. Amostras sólidas ou concentradas (líquidas) necessariamente têm que ser processadas com água e em seguida diluídas na proporção que oferece um melhor cromatograma. Dependendo de sua complexidade exigirá mais ou menos água (solvente).

Neste trabalho, para o preparo do extrato de alface (**item 2.2.3**) o fator de diluição de 1:50 foi estabelecido com base em testes prévios. Esta diluição, dentre as testadas (1:10; 1:25; 1:50), foi a que proporcionou cromatogramas mais limpos.

O processo de diluição para o preparo da solução-amostra ou matrizes mais complexas (sólidas ou líquidas), como é o caso de alimentos tem fundamentos teóricos e é assunto muito discutido na literatura como apresentado no Capítulo I.

Para Lambropoulou e Albanis (2003), a diluição é um processo que reduz os efeitos adversos à extração por MEFS, proporcionados por matérias suspensas e por compostos dissolvidos (açúcares, pectinas e etc, próprios da fruta), porque com eles, os analitos estariam adsorvidos e/ou formando micelas, dificultando o seu alcance até a fibra (interferindo na difusão). Mas na análise por MEFS em *headspace* (HS), não sendo este o caso aqui estudado, a adição de quantias mais altas de água (maior que 1:1) acaba atrapalhando a micro-extração. Isto porque ao diluir a concentração dos analitos, em paralelo e indesejavelmente, também ocorre o aumento da barreira de difusão (água) para os pesticidas saírem da fase aquosa para a fase gasosa. Deste modo, ao contrário do que estes pesquisadores esperavam, para todos os inseticidas, analisados por MEFS-HS, as respostas foram reduzindo à medida que a quantidade de água ia aumentando.

h. Seleção do volume de solução-amostra (V_A)

O volume de amostra, (V_A), ou seja, da fase aquosa onde os analitos se encontram, a ser transferido para o frasco extrator MEFS, neste trabalho, foi fixado em 15,00mL, com base no material disponível, frascos para MEFS-ID de 30,00 mL, permitindo que a fibra ao ser imersa se localize no meio da solução.

O volume V_A necessário para a MEFS varia de acordo com o interesse, disponibilidade de material. De acordo com Pawliszyn (1997) o V_A , pode abranger um espaço sem limites ou ser muito pequeno, da ordem de poucos mililitros, ou muito menos.

i. Seleção da temperatura de extração

Visto que a extração por MEFS não requer que solvente algum seja evaporado, ela pôde ser otimizada sem a necessidade de aquecimento, tornando a formação de produtos secundários bastante reduzida, se não completamente eliminada.

A temperatura de extração utilizada neste trabalho foi a ambiente, sendo mantida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Foi importante manter a temperatura constante dentro de $\pm 2^\circ\text{C}$ durante a extração, uma vez que grandes flutuações afetaram negativamente a taxa de transferência de massa na fase aquosa, reduzindo, significativamente, a reprodutibilidade, afetando a precisão global do método.

Alguns artigos mencionam extrações com aquecimento, mas isto é mais vantajoso para extrações MEFS-HS, uma vez que os analitos passam para o *headspace* com maior velocidade.

De acordo com segundo Pawliszyn (1997) o aquecimento nas extrações por MEFS-ID, a temperaturas de 60°C , reduziu a quantidade extraída de analito. Esse resultado

segundo o autor é esperado, uma vez que ocorre em paralelo aumento da temperatura do revestimento o que é indesejável para a adsorção, que é um fenômeno exotérmico.

j. Preparo de uma nova solução padrão mista de trabalho

A primeira solução mista de trabalho foi feita com cinco agrotóxicos organoclorados (AOC) Lindano, Aldrin, Dieldrin, TDE e Mirex, pois a seqüência do trabalho envolveu, em primeiro lugar, o estudo dos parâmetros da extração destes AOC por MEFS em água fortificada. Depois, para este mesmo estudo em alface, houve a necessidade de incluir mais um agrotóxico, o DDE, preparando-se, assim, uma nova solução padrão mista com seis agrotóxicos, ao invés de cinco como antes. Isto ocorreu porque este AOC foi detectado nas amostras de alface obtidas no comércio quando as mesmas foram analisadas, como será exposto e discutido, mais adiante, no **Capítulo IV** sobre Validação.

A baixa solubilidade do Mirex em metanol fez com que fosse necessário o uso de ultra-som par auxiliar a sua solubilização.

l. Tratamento das vidrarias

Foi desenvolvida uma operação para tratamento de todos os materiais não descartáveis, como vidrarias e outros acessórios, com intuito de eliminar resíduos de difícil remoção. A não detecção de interferentes em solução-branco foi o ponto de partida para o estabelecimento desta operação. O sapólio foi facilmente enxaguado, não se observando vestígios do mesmo na solução-branco. Qualquer sinal produzido por impurezas torna-se fonte de erro para a análise.

m. Soluções-amostra

Foi observado que reservar a amostra fortificada de água e de extrato aquoso de alface, para o dia seguinte, para dar prosseguimento a MEFS, resultava em modificações no perfil cromatográfico e por isto estas soluções foram feitas diariamente, à medida que eram requisitadas para a realização deste estudo.

Após definição dos parâmetros que constituem os procedimentos preliminares, como: seleção da fibra (**item a**), seu condicionamento (**item b**) e monitoramento quanto à limpeza (**item c**); seu posicionamento no injetor (**item d**), tempos de retenção e respostas do detector (**itens e ; f**); seleção da diluição e do volume da solução-amostra (**itens g ; h**) e da temperatura de extração (**item i**), a próxima etapa foi o estudo do tempo necessário para assegurar a dessorção completa dos analitos.

3.1.2 OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE DESSORÇÃO

A etapa de dessorção foi realizada com o binômio tempo-temperatura apropriado no injetor, para um máximo de dessorção dos analitos de interesse.

Como já mencionado anteriormente, para a otimização desta etapa foi necessário estabelecer, previamente, o comprimento da agulha para a fibra atingir o melhor ponto de aquecimento do injetor, condicionar a fibra e monitorar o efeito memória. Estas operações preliminares foram discutidas nos **itens b ; c ; d**

As condições cromatográficas CGAR/DCE, utilizadas para a determinação do t_D no presente estudo, foram desenvolvidas a partir de testes aplicando-se dados obtidos da literatura. O teste iniciou mantendo-se a temperatura do forno a 50°C por 5 minutos, a partir do qual, iniciou-se o aquecimento gradativo (50°C/ min) até 250 °C (mantendo-se nesta durante 1 min), perfazendo um tempo de corrida de 10 minutos, não resultando em um bom perfil cromatográfico. Após outras tentativas estabeleceu-se a que está presente no **(item 2.2.4)**.

As dessorções térmicas foram realizadas em tempos variados, com o injetor a 250°C, (no modo *splitless* por tempo igual ao tempo usado para a dessorção), na **solução-amostra 1** (água fortificada a 10 ng/mL) e na **solução-amostra 2** (extrato aquoso fortificado de alface a 10 ng/mL), que foram preparadas segundo os **itens 2.2.3.a e 2.2.3.b**, respectivamente. Vale lembrar que no estudo com a matriz alface foi envolvido mais um agrotóxico, o DDE.

A adsorção dos analitos, foi realizada por imersão da fibra no meio da amostra (MEFS-ID), com t_E e agitação constantes, como descrito a seguir.

(a) Estudo do tempo de dessorção dos agrotóxicos organoclorados em amostra de água fortificada

A fibra foi imersa em 15,00 mL da **solução-amostra 1**. A extração foi realizada com agitação de 1.200 rpm, por 15 minutos. Após este tempo, a fibra foi retraída e retirada da solução, seguindo para dessorção térmica em tempos variados.

Os tempos de dessorção estudados foram cinco: 60 ; 120 ; 240 ; 360 e 480 segundos. Após vários testes, foi observado que estes tempos tinham que ser marcados com um cronômetro digital para assegurar uma menor variação possível e, assim, melhor eficiência na separação. Além do mais, os agrotóxicos organoclorados são instáveis quando submetidos a altas temperaturas.

As médias das áreas obtidas para cada tempo de dessorção e para cada analito foram plotadas no gráfico apresentado na **Figura 13**.

As médias das áreas dos agrotóxicos (**Figura 13**), de modo geral, aumentaram com o tempo de dessorção. Isto era esperado, uma vez que a dessorção depende da temperatura e do tempo no injetor.

O Aldrin foi o que menos foi influenciado pelo aumento da temperatura, seguido pelo Mirex e pelo Lindano. Os mais favorecidos pelo aumento de temperatura foram o TDE e o Dieldrin, talvez por serem os mais fortemente adsorvidos pela fibra.

Na **Figura 13** observa-se também que, para todos os agrotóxicos, a influência do acréscimo da temperatura foi mais evidente até 240 segundos, a partir do qual pode-se visualizar uma tendência a se tornar constante.

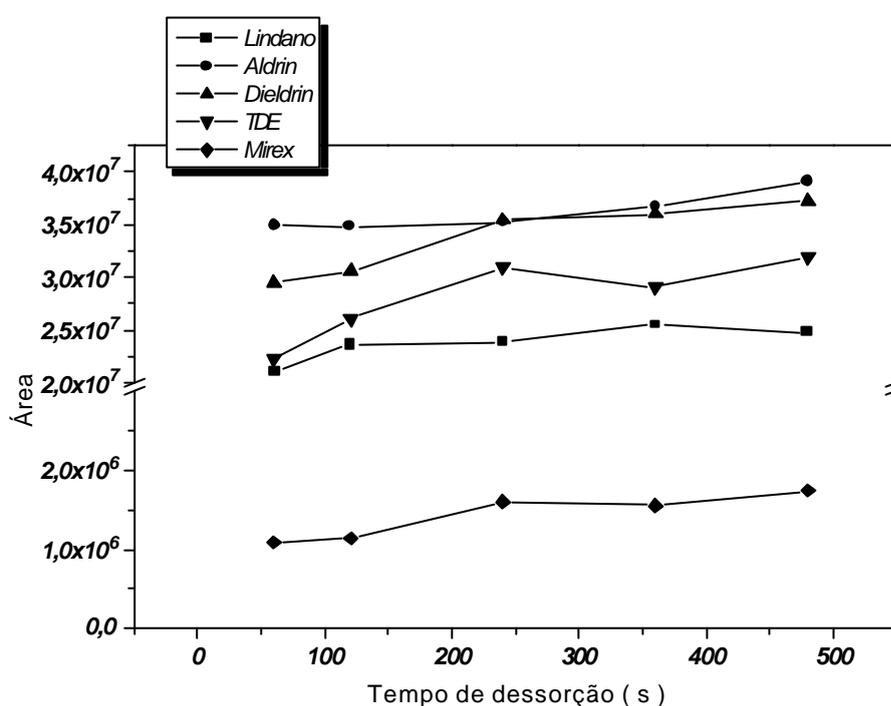


Figura 13 Influência do tempo de dessorção (250°C) dos agrotóxicos, na obtenção dos sinais analíticos, na amostra fortificada de água a 10 ng/mL, após MEFS-ID em $t_E = 15$ min e PDMS-100, sob agitação por 1.200 rpm

Verificou-se também neste experimento, através das repetições realizadas em cada tempo, que nos tempos de 120 e 240 segundos, as medidas das áreas obtidas variaram menos do que nos outros tempos. Com exceção do Mirex, os coeficientes de variação não foram maiores do que 10%. Este fato contribuiu para a escolha do tempo de dessorção de 120 segundos.

A decisão final para a escolha do tempo de dessorção ideal, foi complementada em função das maiores áreas e do melhor perfil cromatográfico. Neste experimento, para cada analito, as médias das áreas (N=3), obtidas em cada tempo de dessorção, foram submetidas

à análise de variância (nível de 95% de confiança). Os resultados obtidos indicaram que o tempo de dessorção mínimo, a partir do qual as médias das áreas já não possuíam diferença significativa entre si, foi o de 120 segundos. Deste modo, este foi seguramente o tempo escolhido para as análises subseqüentes.

O Mirex apresentou um CV médio de 18%, para todos os tempos, o que contribuiu para que as diferenças de suas áreas médias ao longo dos tempos de dessorção testados não fossem significativamente diferentes entre si.

Hong-Ping e colaboradores (2003), também encontraram um tempo de dessorção de 120 segundos a 250°C. Zambonin e colaboradores (2004) relataram que o tempo de dessorção geralmente é inferior a 240 segundos, a 250°C.

Nas **Figuras 13A** e **13B** podem ser observados os cromatogramas relativos ao experimento em cada tempo de dessorção.

Através dos cromatogramas observa-se que, o método proposto permitiu que os agrotóxicos em concentrações ppb (10 ng/mL) fossem analisados com boa resolução em uma linha de base constante. A presença de pequenos picos pode ser observada, o que pode ser devido à degradação do padrão por efeito da temperatura ou a impurezas.

Em todos os cromatogramas das **Figuras 13-A** e **13-B** evidencia-se que os picos registrados apresentaram resoluções adequadas e com áreas semelhantes, com exceção do Mirex (cuja área foi relativamente menor).

Estes resultados, levando em conta a concentração ao nível de ppb, indicam que o método proposto MEFS-ID/CGAR/DCE é indicado para análise de organoclorados do grupo dos hexaclorados (como o lindano), dos DDTs (como o TDE) e dos ciclodienos como é o caso do Aldrin e do Dieldrin. Para o Mirex (ciclodieno) vale a realização de estudos isolados sobre o seu comportamento com mudança de solvente, não sendo indicado na análise de multi-resíduos, nas condições do presente trabalho.

Nestes cromatogramas pode-se observar também que em tempos de dessorção de 240, 360 e 480 segundos (cromatograma (3) da Figura 13-A e cromatogramas (4) e (5) da figura 13-B) pequenos picos surgiram a partir do tempo de retenção entre o Dieldrin e o TDE e outros entre o TDE e o Mirex, e após este. Isto provavelmente é devido ao surgimento de produtos de degradação dos agrotóxicos estudados (expostos a tempo maior em temperatura tão elevada). Como já mencionado anteriormente, os organoclorados são sensíveis a altas temperaturas. Este fato contribuiu também para a escolha do tempo de dessorção de 120 segundos.

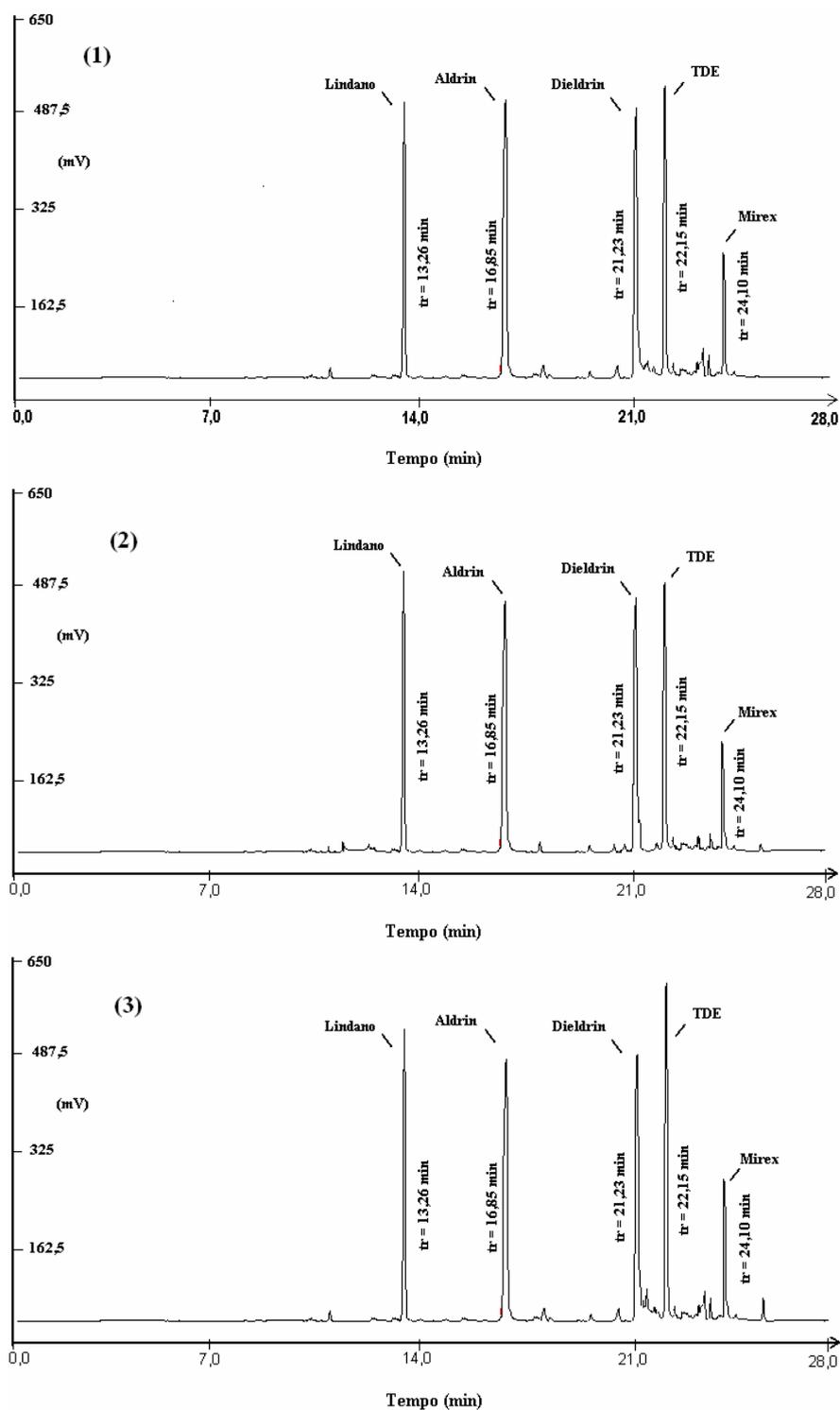


Figura 13.A: Cromatogramas de análise por MEFS-ID/CGAR/DCE de agrotóxicos na solução - amostra de água fortificada (10 ng/mL) com extração por PDMS-100 sob agitação a 1.200 rpm com $t_E = 15$ min em diversos tempos de dessorção (1) $t_D = 60s$; (2) $t_D = 120s$; (3) $t_D = 240s$

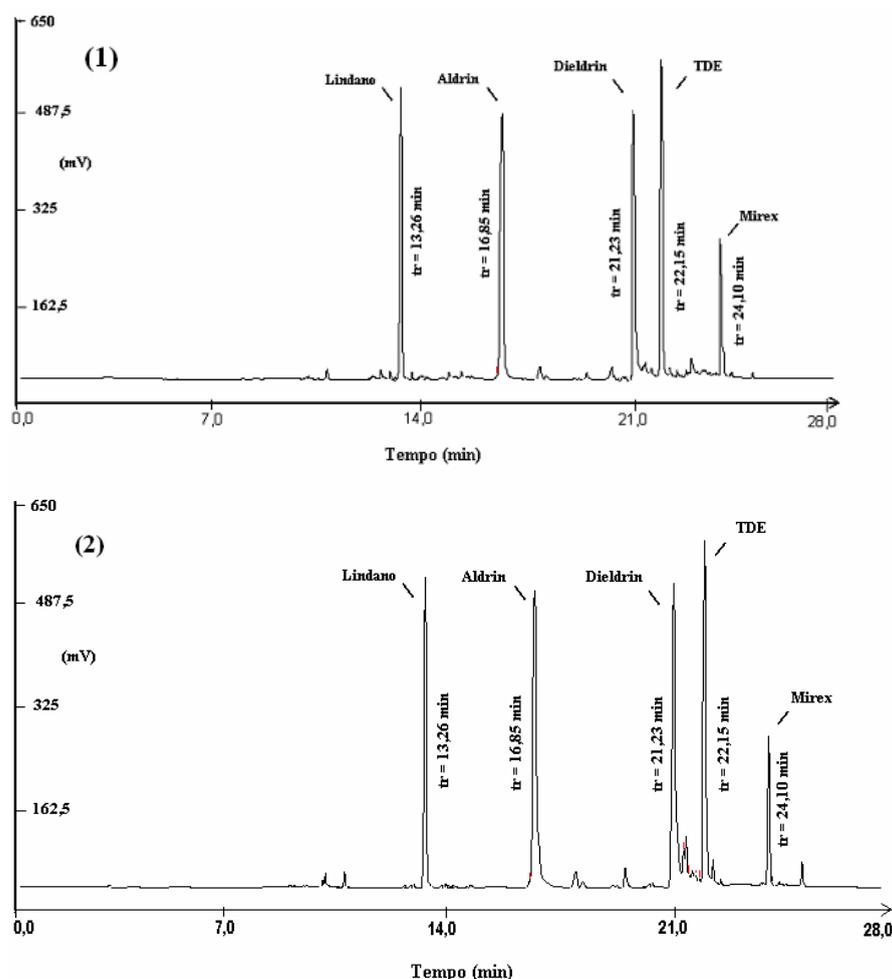


Figura 13.B Cromatogramas de análise por MEFS-ID/CGAR/DCE de agrotóxicos na solução – amostra de água fortificada (10 ng/mL) com extração por PDMS-100 sob agitação a 1.200 rpm com $t_E = 15$ min em diversos tempos de dessorção (1) $t_D = 360$ s; (2) $t_D = 480$ s

(b) Estudo do tempo de dessorção dos agrotóxicos organoclorados em amostra de alface fortificada

Este estudo foi realizado como no item anterior, trocando a água por extrato aquoso de alface (**solução-amostra 2**), envolvendo somente três tempos de dessorção ao invés de cinco, como segue:

A fibra foi imersa em 15,00 mL da **solução-amostra 2**. A extração foi realizada com agitação de 1.200 rpm, por 15 minutos. Após este tempo, a fibra foi retraída e retirada da solução seguindo para dessorção térmica nos tempos estudados de 60 ; 120 e 240 segundos. Estes tempos foram os mais marcantes em termos de dessorção dos analitos, por isto foram os escolhidos. Além do mais tempos maiores poderiam causar danos a fibra, uma

vez que a matriz é mais complexa, podendo decompor algum de seus componentes e/ou aderir-los na fibra.

Os valores das médias de cada agrotóxico, em cada tempo testado, foram plotados em gráfico. Os resultados obtidos com este estudo encontram-se na **Figura 14**.

Na **Figura 14**, pode-se observar que o comportamento de cada agrotóxico, no que diz respeito a dessorção, teve a mesma tendência observada que no experimento anterior, com a água. O Dieldrin foi o que mais foi favorecido com o aumento do tempo e o Mirex o que praticamente ficou inerte.

Como a análise estatística da comparação entre as médias das áreas obtidas, de acordo com as variâncias, não indicou diferença significativa entre os seus valores, optou-se em trabalhar, com a matriz alface, com tempo de dessorção de 120 segundos (como o escolhido para a água). Trabalhar com o tempo mínimo capaz de gerar resultados confiáveis foi a prioridade neste experimento, pelo que já foi mencionado: temperatura vs estabilidade do organoclorado.

Os resultados indicaram também que a mudança da matriz não influenciou na dessorção dos analitos. Mas isto não significa que o mesmo vai ocorrer com outras matrizes. Aquelas ricas em açúcar, por exemplo, o enfoque deverá ser direcionado ao fato da facilidade de ocorrer a caramelização na própria fibra no injetor a 250°C. Então, para cada matriz a ser analisada deve-se proceder conforme o descrito neste experimento. A otimização deste parâmetro, avaliada com cuidado e observação, é tarefa que não deve ser esquecida. Na literatura consultada, o assunto matriz vs tempo de dessorção não foi encontrado.

Na **Figura 14-A** a seguir, encontram-se ilustrados três cromatogramas representativos de cada tempo de dessorção. Através destes cromatogramas pode-se observar que a linha de base também se manteve constante. Mesmo em concentrações de ppb (10 ng/mL), foi possível a detecção dos agrotóxicos estudados em matriz mais complexa que a água. As fortificações no extrato aquoso de alface permitiram perceber que a matriz influencia na área, mas não no perfil cromatográfico e na sua resolução.

Os pequenos picos na linha de base sugerem que alguns componentes da matriz foram também extraídos e dessorvidos. Tais componentes, em pequeníssimas quantidades, provavelmente são lipossolúveis como os agrotóxicos.

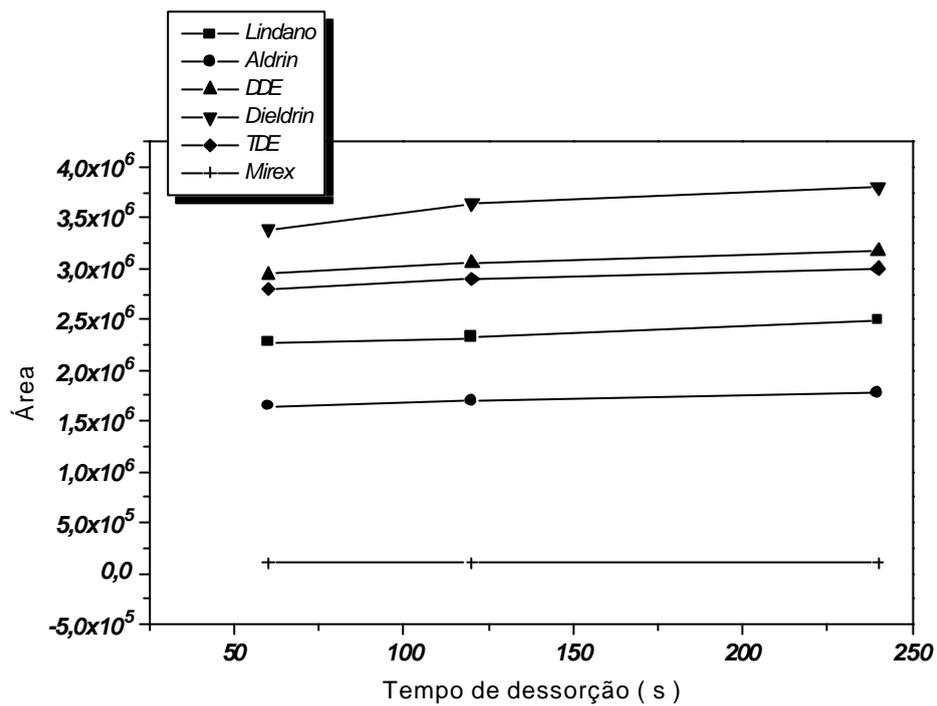


Figura 14 Influência do tempo de dessorção (250°C) dos agrotóxicos na obtenção dos sinais analíticos, na amostra fortificada de extrato aquoso de alface a 10 ng/mL , após MEFS-ID em $t_E=15 \text{ min}$ e PDMS-100, sob agitação por 1.200 rpm

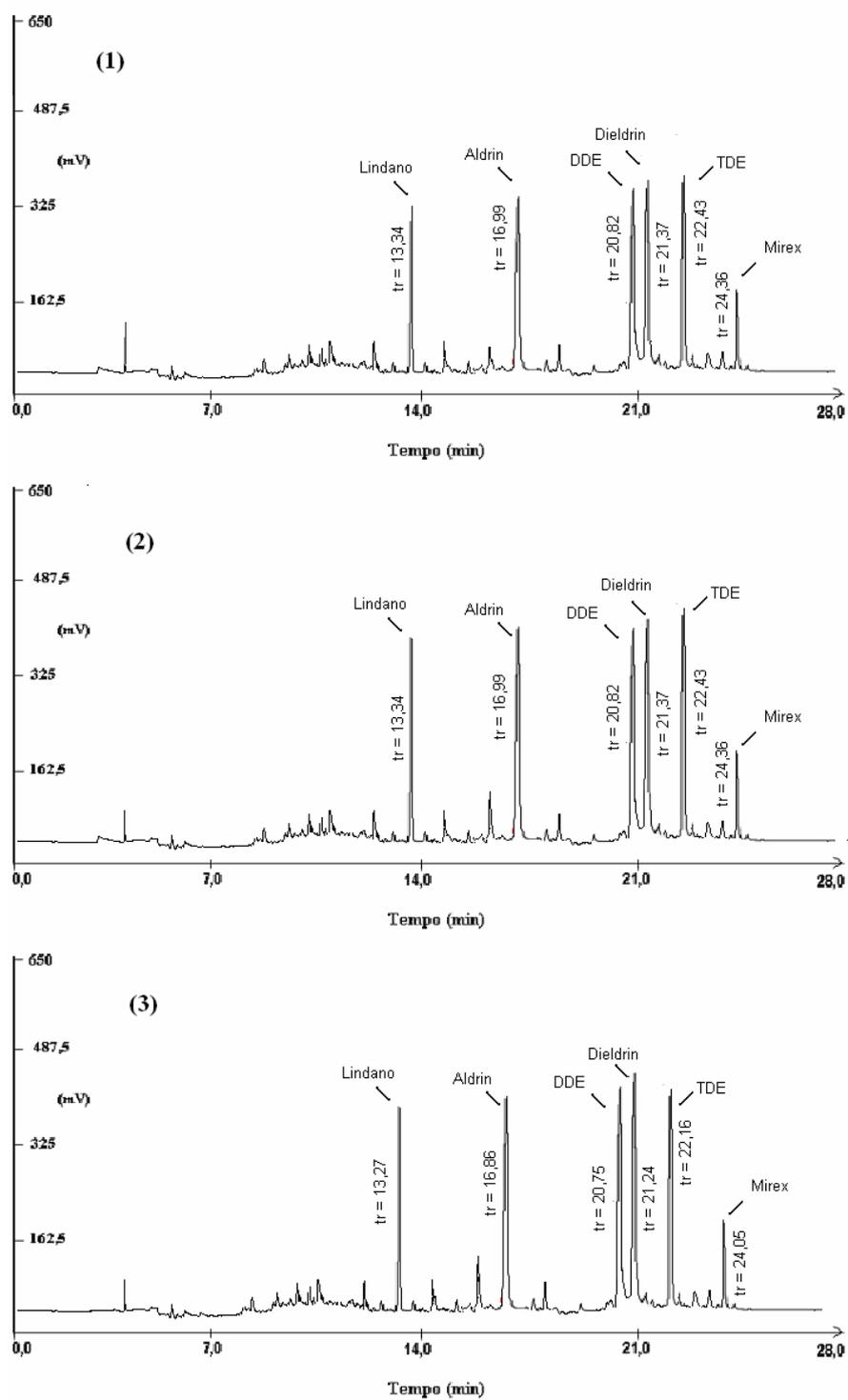


Figura 14-A: Cromatogramas de análise por MEFS-ID/CGAR/DCE de agrotóxicos na solução - amostra de extrato aquoso de alface fortificada (10 ng/mL) com extração por PDMS-100 sob agitação a 1.200 rpm com $t_E = 15$ min, em diversos tempos de dessorção: (1) $t_D = 60s$; (2) $t_D = 120s$; (3) $t_D = 240s$.

(c) Conclusões sobre a influência do tempo de dessorção dos agrotóxicos sobre a produção dos sinais analíticos

O melhor tempo de dessorção foi o de 120 segundos, tanto para a água quanto para a alface.

Para cada matriz é necessário que ocorra a otimização do tempo de dessorção. A matriz influencia na área detectada dos agrotóxicos organoclorados.

3.1.3 OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE EXTRAÇÃO

A otimização da etapa de extração foi realizada através de estudos sobre o tempo e as condições do meio no momento em que a fibra ficou imersa na solução-amostra, em contato com os analitos (t_E) e subsequente adsorção, considerando o comprometimento com parâmetros que direta ou indiretamente contribuem para aumentar a sua eficiência e precisão de seus resultados.

A otimização da etapa de extração envolveu o estabelecimento dos seguintes parâmetros:

- 3.1.3.1 Uso da agitação
- 3.1.3.2 Velocidade de agitação
- 3.1.3.3 Tempo de extração (t_E)
- 3.1.3.4 Força iônica
- 3.1.3.5 pH

Todos estes parâmetros, de acordo com a natureza do analito, constituem condições que poderão influenciar o transporte de massa, favorecendo ou não a extração. Seus estabelecimentos devem ser cuidadosamente estudados em cada situação em combinação com os procedimentos preliminares, pois podem ter um pronunciado efeito sobre a cinética de extração e/ou sobre a quantidade total extraída após um certo tempo de exposição.

Tal como ocorreu na determinação do tempo da dessorção, a otimização da etapa de extração foi realizada na **solução-amostra 1** (água) e na **solução-amostra 2** (alface) nas mesmas condições cromatográficas CGAR/DCE (**item 2.2.4**).

3.1.3.1 Estudo sobre o efeito da agitação na micro-extração dos agrotóxicos

O presente estudo sobre o efeito da agitação na micro-extração dos agrotóxicos foi realizado por MEFS-ID no modo dinâmico (agitado) e no modo estático (parado), mantendo-se o t_E e o t_D constantes.

(a) Estudo do efeito da agitação sobre a MEFS na amostra fortificada de água

Para este estudo, como no anterior, a fibra foi imersa em 15,00 mL da **solução-amostra 1**. A extração foi realizada com e sem agitação (1.200 rpm) por 30 minutos. Em primeiro lugar, a extração foi realizada no modo estático e, após este tempo, a fibra foi retraída e retirada da solução seguindo para a dessorção térmica (250°C), fixada em 8 minutos.

Foi observado que as médias das áreas de todos os agrotóxicos, obtidas sem agitação, foram muito pequenas em relação aos outros testes até então realizados. Após esta etapa, procedeu-se a extração com agitação, a 1.200 rpm, nas mesmas condições anteriores. Com agitação, as médias das áreas aumentaram.

As médias das áreas para todos os agrotóxicos obtidos nos dois experimentos (com e sem agitação) foram plotados para a construção de um gráfico.

Na **Figura 15**, encontra-se o gráfico com os resultados obtidos.

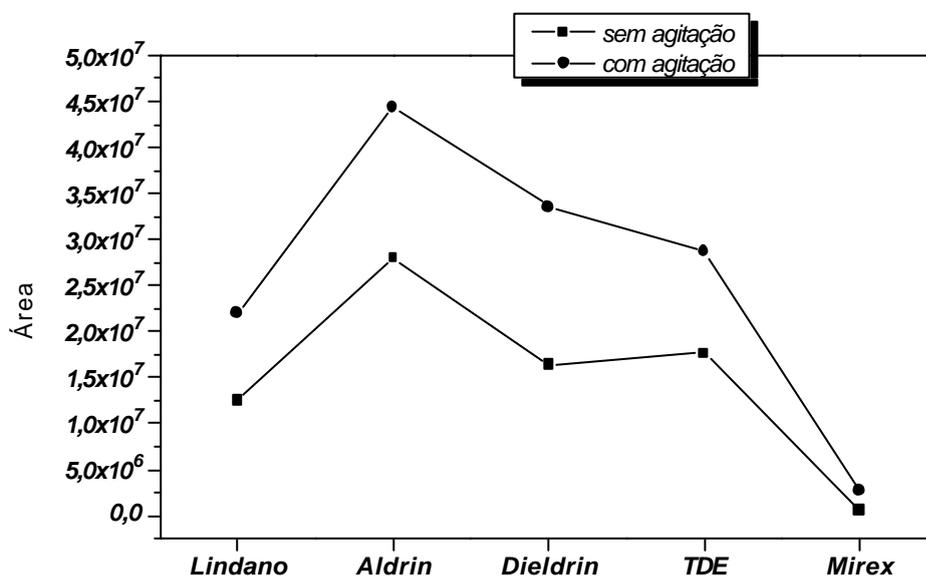


Figura 15 Influência da agitação sobre a micro-extração dos agrotóxicos na amostra fortificada de água a 10 ng/mL, após MEFS-ID/CGAR/DCE, em tE = 30 min e PDMS-100 e tD = 8 min (250oC) sem agitação ou sob agitação a 1.200 rpm

Como pode ser observado na **Figura 15**, o agrotóxico que mais foi favorecido foi o Dieldrin, seguido do Aldrin e do TDE. O Lindano e, muito mais ainda, o Mirex foram os menos favorecidos. Provavelmente a agitação auxilia com mais intensidade a adsorção dos analitos com mais afinidade pela fibra.

No modo estático, o transporte do analito para a fibra fica limitado a sua difusão tanto na fase aquosa (amostra), quanto na camada aquosa existente na superfície da fibra. Durante o processo de adsorção, o gradiente de concentração nesta camada é menor ainda, reduzindo o fluxo dentro da fibra.

No modo dinâmico, somente a camada de água sobre a superfície da fibra polimérica ainda permanece estática, logo, a taxa de extração é limitada somente pela difusão (lenta) através desta camada. Normalmente, a quantidade adsorvida pela fibra pode, então, ser facilmente aumentada, com agitação da amostra aquosa.

A comparação estatística entre as médias das áreas obtidas, nos modos estático e dinâmico, indicou que as mesmas eram significativamente diferentes entre si.

A agitação promoveu um aumento nas médias das áreas dos picos obtidos que variou de 60 (Mirex) a 340% (Dieldrin), dependendo do agrotóxico, em relação ao modo sem agitação.

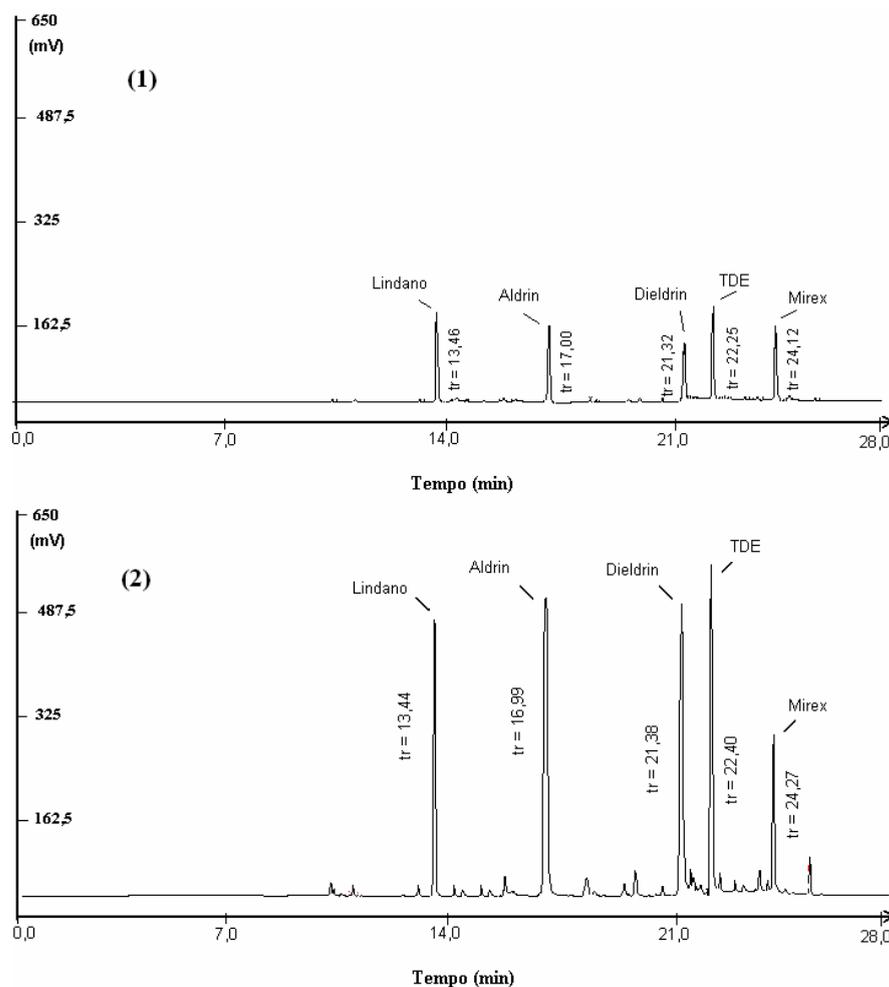


Figura 15-A Cromatogramas de análise por MEFS-ID/CGAR/DCE de agrotóxicos na solução-amostra de água fortificada (10 ng/mL) com extração em $t_E = 30$ min e PDMS-100 e $t_D = 8$ min (250°C): (1) sem agitação ou (2) sob agitação a 1.200 rpm

Além de proporcionar aumento na extração, a agitação promoveu também uma maior repetitividade dos resultados o que pôde ser verificado a partir dos coeficientes de variação em cada modalidade testada.

Na Figura 15-B pode-se observar as diferenças nos coeficientes de variação obtidos pelos dois métodos.

Com agitação foram obtidos excelentes resultados, pois todos os agrotóxicos foram extraídos com coeficientes de variação que não excederam a 15% (exceto no caso do Mirex cujo CV foi de 37%). Este resultado indica que a agitação promoveu uma difusão mais homogênea na superfície da fibra.

Coeficiente de Variação das Médias das Áreas em função do modo de agitação

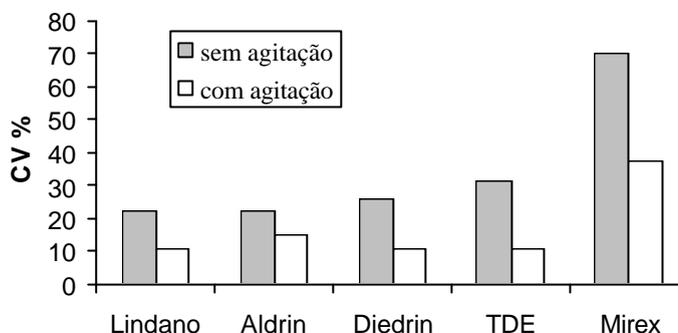


Figura 15-B Comparação entre os coeficientes de variação das médias das áreas correspondentes aos modos de extração, com e sem agitação na análise de agrotóxicos por MEFS-ID/CGAR/DCE na solução –amostra de água fortificada (10 ng/mL) com tE = 30 min e PDMS-100 e tD = 8 min (250oC)

Uma atenção simples, mas especial, deve ser, direcionada para a realização da agitação: é importante manter uma velocidade de agitação constante para obtenção de resultados reprodutíveis. Pequenas variações na velocidade podem gerar altos CV%. Deste modo optou-se por dar continuidade aos experimentos de extração usando o modo MEFS-ID com agitação.

(b) Estudo sobre o efeito da agitação sobre a MEFS na amostra de alface fortificada

Este estudo foi realizado como no item anterior, trocando a água por extrato aquoso de alface (**solução-amostra 2**), como segue:

A fibra foi imersa em 15,00 mL da **solução-amostra 2**. A extração foi realizada com e sem agitação (1.200 rpm) por 30 minutos. Após este tempo, a fibra foi retraída e retirada da solução seguindo para a dessorção térmica (250°C), por 8 min.

Os valores das médias de cada agrotóxico, em cada modalidade testada, foram plotados em gráfico. Os resultados obtidos com este estudo encontram-se na **Figura 16**.

Na **Figura 16**, pode-se observar que o comportamento de cada agrotóxico, no que diz respeito a dessorção, teve a mesma tendência observada que no experimento anterior, com a água. Neste caso também, a adsorção dos analitos foi diretamente proporcional à sua difusão na solução, sendo favorecida com a agitação devido a proporcionar uma taxa maior de transferência de massa.

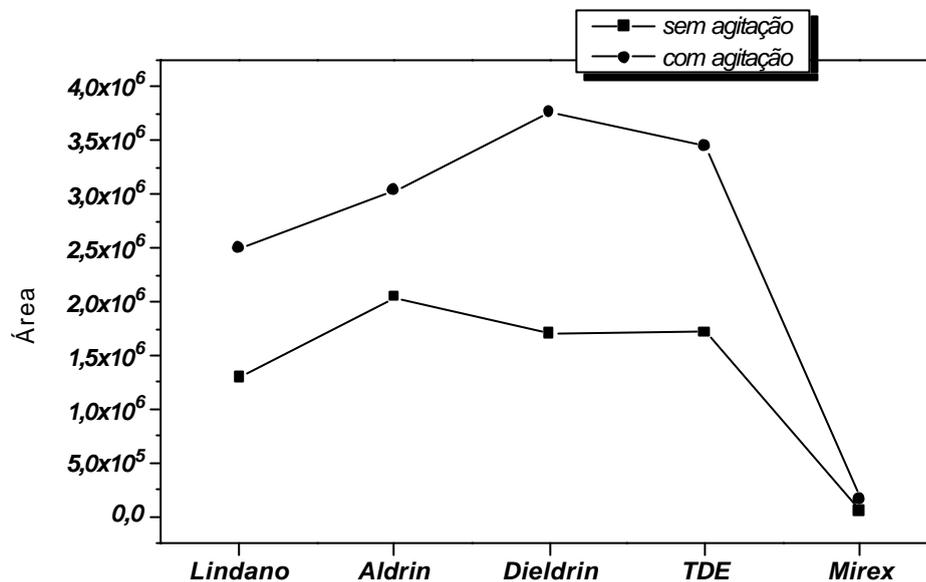


Figura 16 Influência da agitação sobre a micro-extração dos agrotóxicos na amostra de extrato aquoso de alface a 10 ng/mL, após MEFS-ID, em $t_E = 30$ min e PDMS-100, sob agitação por 1.200 rpm e $t_D = 8$ min (250°C)

Como pode ser observado na **Figura 16**, o Dieldrin foi o mais favorecido com a agitação (200% de aumento na média de suas áreas) e o menos favorecido foi o Mirex (50%), em relação ao modo sem agitação.

Na Figura 16-A pode-se observar com mais detalhes os resultados obtidos através dos cromatogramas relacionados aos dois métodos (estático e dinâmico).

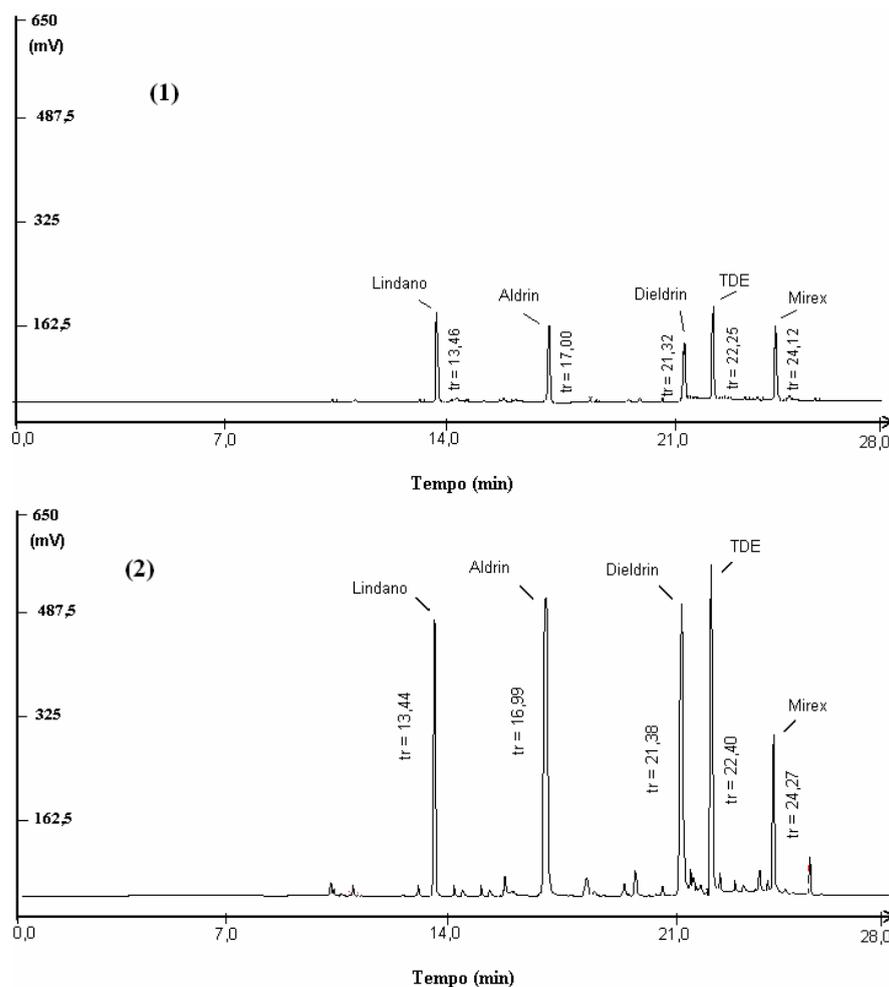


Figura 16-A Cromatogramas de análise por MEFS-ID/CGAR/DCE de agrotóxicos na solução-amostra de água fortificada (10 ng/mL) com extração em $t_E = 30$ min e PDMS-100 e $t_D = 8$ min (250°C): (1) sem agitação ou (2) sob agitação a 1.200 rpm

O comportamento diferenciado dos agrotóxicos (uns mais favorecidos e outros menos) reforça a idéia de que a extração depende também da afinidade do analito pela fibra.

A comparação estatística entre as médias das áreas obtidas, nos modos estático e dinâmico, indicou que as mesmas eram significativamente diferentes entre si.

(c) Conclusões sobre o efeito da agitação sobre a MEFS.

A agitação feita no momento da amostragem por MEFS foi necessária para facilitar o transporte dos analitos para a fase estacionária.

Além de proporcionar aumento na extração, a agitação promoveu também uma maior repetitividade dos resultados

Deste modo optou-se por dar continuidade aos experimentos de extração usando o modo MEFS-ID com agitação, cuja velocidade ideal, foi estabelecida no item a seguir.

3.1.3.2 Estudo da influência da velocidade de agitação sobre a extração

Com uma agitação ineficiente, uma camada de água, dificilmente agitada, costuma permanecer próximo à fibra sendo capaz de limitar a taxa de extração devido ao baixo coeficiente de difusão do analito nesta camada. Sem agitação intensa da solução aquosa, a eficiência da extração foi reduzida. Isto foi verificado com detalhe no item anterior, quando foi testada a extração sem agitação.

No presente estudo, a escolha da melhor velocidade de agitação, foi realizada mantendo-se constantes o t_E de 30 min (não otimizado), t_D de 480 segundos (não otimizado) e extrações por MEFS-ID sob agitação em velocidades variadas na faixa de 0 a 1.200 rpm.

Vale mencionar, que as velocidades (600, 900 e 1.200 rpm) usadas neste experimento correspondem às velocidades de calibração do agitador magnético, indicadas no manual, não significando que a solução tenha atingido exatamente este valor.

(a) Estudo da influência da velocidade de agitação sobre a MEFS na amostra fortificada de água

A fibra foi imersa em 15,00 mL da **solução-amostra 1**, sendo realizados os estudos com agitação, nas velocidades 0 ; 600 ; 900 e 1.200 rpm.

Em função do equipamento utilizado não foi possível estudar velocidades maiores do que 1.200 rpm.

Após 30 minutos de extração, sob agitação na velocidade selecionada, a fibra foi retraída e retirada da solução seguindo para dessorção térmica (250°C), por 480 segundos.

As médias das áreas obtidas para cada agrotóxico, foram plotadas em gráfico de acordo com a velocidade estudada, encontrando-se na **Figura 17**.

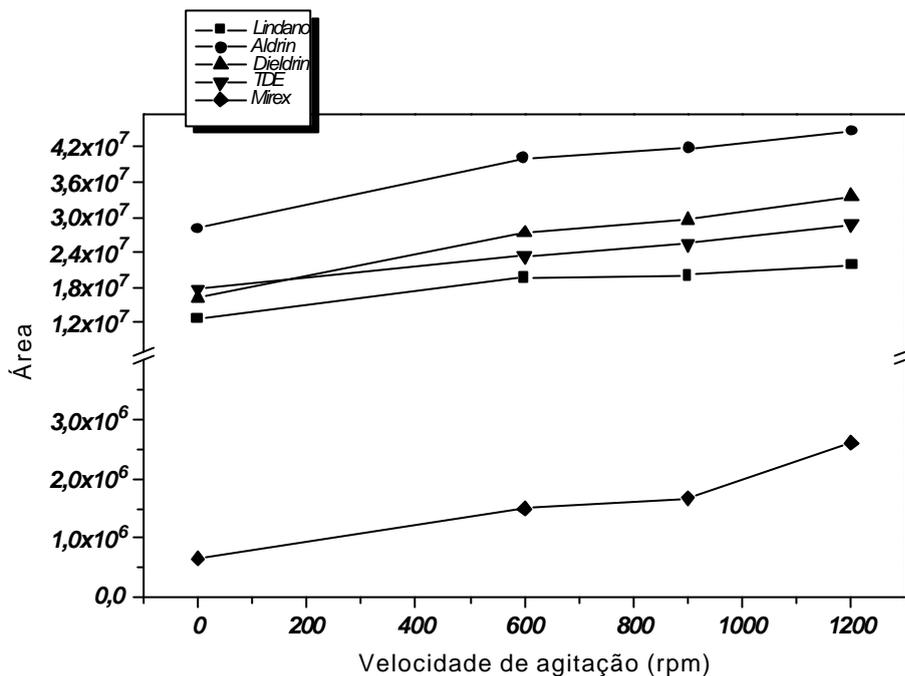


Figura 17 Influência da agitação sobre a micro-extração dos agrotóxicos na amostra fortificada de água a 10 ng/mL, após MEFS-ID, em $t_E=30$ min e PDMS-100, sob agitação na faixa de 0 a 1.200 rpm e $t_D = 8$ min (250°C)

Como pode ser observado nas **Figuras 17**, para todos os agrotóxicos, a medida que a velocidade foi aumentando, maiores sinais foram produzidos, não entrando em fase constante, embora em velocidades maiores do que 600 rpm tenham produzido uma inclinação na curva menor do que em velocidades menores.

As diferenças nas médias das áreas obtidas ocorridas pela agitação foram visualizadas com maior facilidade no experimento anterior com e sem agitação.

Além de proporcionar maior sinal analítico, a velocidade de 1.200 rpm foi a que proporcionou menor coeficiente de variação, indicando que, nesta velocidade, ocorre uma maior precisão nos resultados.

Deste modo, a velocidade máxima de 1.200 rpm, onde maiores áreas foram alcançadas, foi a escolhida para as análises subsequentes neste trabalho.

(b) Estudo da influência da velocidade de agitação sobre a MEFS na amostra de extrato aquoso de alface fortificada

Seguindo os mesmos procedimentos do sub-item anterior, a fibra foi imersa em 15,00 mL da **solução-amostra 2**, sendo realizados os estudos com agitação, nas velocidades 0; 600 e 1.200 rpm, por 30 minutos.

Após este tempo, a fibra foi retraída e retirada da solução sendo levada para a dessorção térmica por 480 segundos.

Os resultados obtidos com este estudo encontram-se na **Figura 18**, mostrando resultados semelhantes ao experimento anterior realizado com água fortificada, indicando que a velocidade máxima de 1.200 rpm, foi a que produziu maiores sinais analíticos para todos os agrotóxicos, favorecendo o transporte dos analitos da solução-amostra para a fibra.

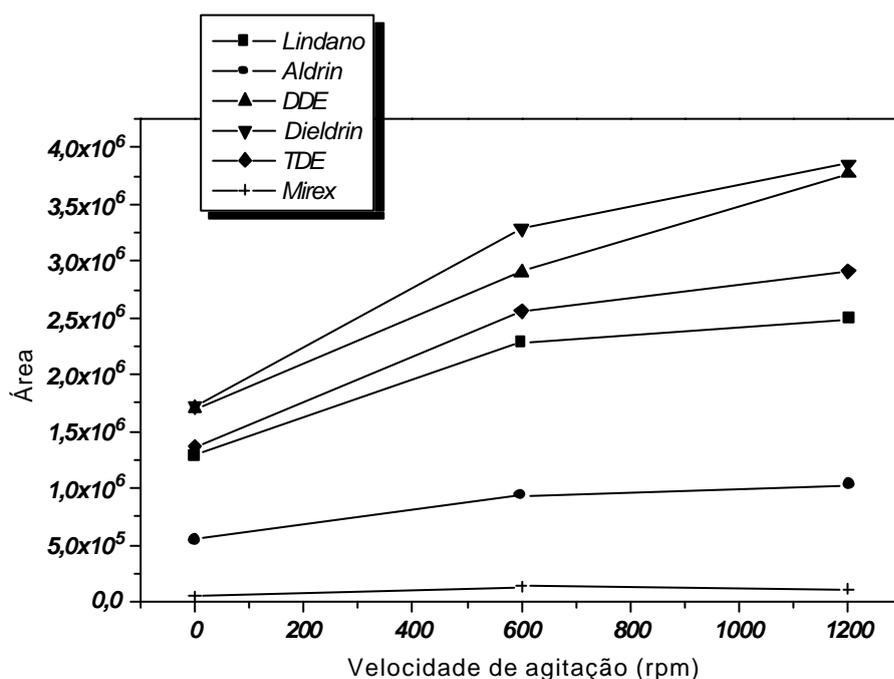


Figura 18 Influência da agitação sobre a micro-extração dos agrotóxicos na amostra no extrato aquoso de alface fortificada a 10 ng/mL, após MEFS-ID, em $t_E=30$ min e PDMS-100, sob agitação na faixa de 0 a 1.200 rpm e $t_D = 8$ min (250°C)

Comparando os gráficos das **Figuras 17 e 18** pode ser notado que a inclinação da curva entre 0 e 600 rpm foi maior com o extrato aquoso de alface, do que com a água. Este

fato provavelmente se deve a presença de partículas aderidas na fibra impedindo a adsorção, que em um primeiro movimento da solução, tenham sido removidas.

Neste experimento mais uma vez verificou-se que o Mirex foi o menos extraído. O Lindano na alface passou a ser mais extraído do que o TDE. Isto pode ter ocorrido devido à mudança da matriz.

O comportamento dos analitos face à extração depende da natureza própria, da fibra e da matriz.

Muitas vezes a agitação pode ser um fator adverso quando as partículas tendem a se sedimentar, deixando a solução mais límpida sem bloquear a fibra. Não foi o caso da matriz alface, provavelmente, por não ser constituída de partículas facilmente precipitáveis.

A utilização de uma ultracentrífuga é um meio de separar tais partículas.

(c) Conclusões sobre o estudo da influência da velocidade de agitação sobre a MEFS

A agitação foi um recurso positivo na extração para as matrizes estudadas. O aumento da velocidade na extração leva a maior eficiência na extração e maior repetitividade.

3.1.3.3. Estudo do Tempo de Extração (t_E) dos agrotóxicos organoclorados

O tempo de extração (t_E), ou tempo de imersão, é um dos mais importantes parâmetros a serem otimizados para garantir um bom desempenho nos procedimentos MEFS.

É uma variável extrínseca ao meio extrator, que corresponde ao tempo de contato entre a fase extratora e a fase extraída, podendo ser menor ou igual ao tempo de adsorção no equilíbrio (t^∞).

Para verificação do melhor tempo de adsorção, fora do equilíbrio de adsorção, (que costuma ser atingido em média de 60 min) uma faixa de t_E de 1 a 35 minutos para as extrações MEFS-ID foi estudada, mantendo-se os parâmetros otimizados anteriormente, como velocidade constante de 1.200 rpm e t_D também constante (120s).

(a) Estudo do t_E e m solução-amostra de água fortificada

Para a determinação do tempo de extração ideal realizaram-se extrações em vários tempos com a fibra imersa em 15,00 mL da **solução-amostra 1**, sob agitação a 1.200 rpm.

Foram estudados nove tempos de extração: 1; 3; 5; 10; 15; 20; 25; 30 e 35 minutos, com fibra PDMS 100 μm .

Transcorrido o tempo de contato com a amostra, a fibra foi retraída e retirada da solução, seguindo para dessorção térmica com t_D constante de 120s.

As médias das áreas para cada agrotóxico, obtidas em cada experimento, foram plotadas com o t_E testado. Os resultados encontram-se na **Figura 19**.

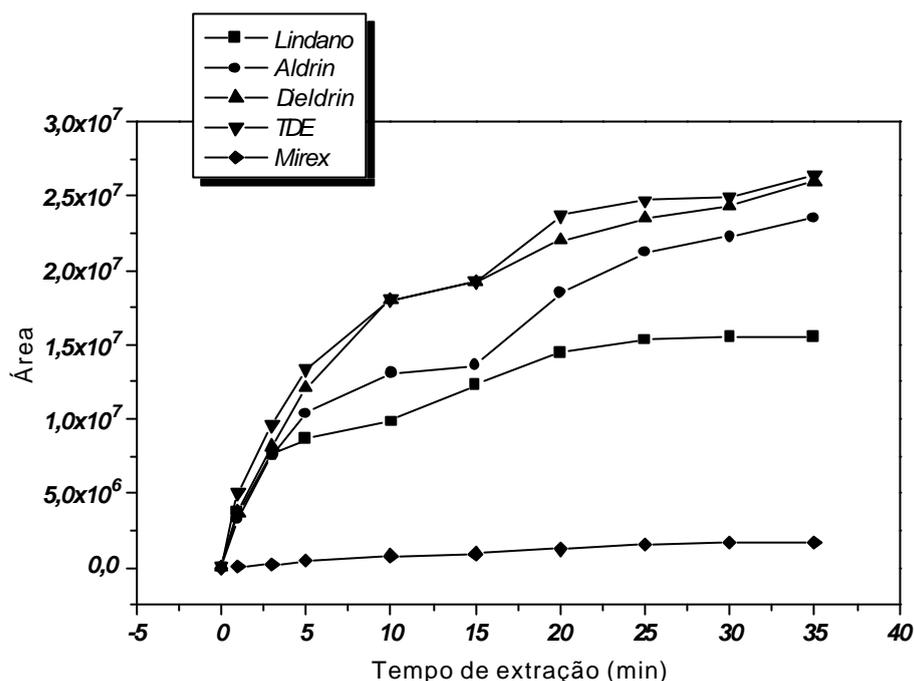


Figura 19 Influência do tempo de extração (min) na micro-extração dos agrotóxicos estudados, em solução-amostra de água fortificada a 10 ng/mL (PDMS 100 μm ; $t_D = 120\text{s}$ (25 $^{\circ}\text{C}$); agitação 1.200 rpm)

Na **Figura 19** pode-se observar que as variações das médias das áreas elevaram-se com maior intensidade até cinco minutos de extração, para todos os agrotóxicos com exceção do Mirex.. Após este tempo, as variações não ocorrem com a mesma taxa.

A partir de 20 min a extração do Lindano mostra claramente a tendência em se estabilizar. Isto, provavelmente, se deve ao fato deste analito possuir maior difusão e maior solubilidade em água do que o restante dos analitos. A maior solubilidade em água restringe a quantidade que vai para a fibra.

A extração do Aldrin, do Dieldrin e do TDE mostrou que o tempo de 35 minutos ainda não foi o suficiente para atingir o equilíbrio. Mas através da análise estatística, ficou constatado que, para todos os agrotóxicos, a partir de 20 minutos (inclusive) as diferenças

nas médias das áreas obtidas já não eram mais significativas, ao nível de 95 % de confiança. Deste modo, este foi o tempo escolhido como ideal para a análise destes agrotóxicos em água.

Além de ser desnecessário tempos maiores, foi verificado também que com 20 min as variações das médias das áreas obtidas foram as menores, para todos os agrotóxicos.

Na **Figura 19-A** pode-se observar as diferenças dos coeficientes de variação de acordo com o tempo de extração estudado.

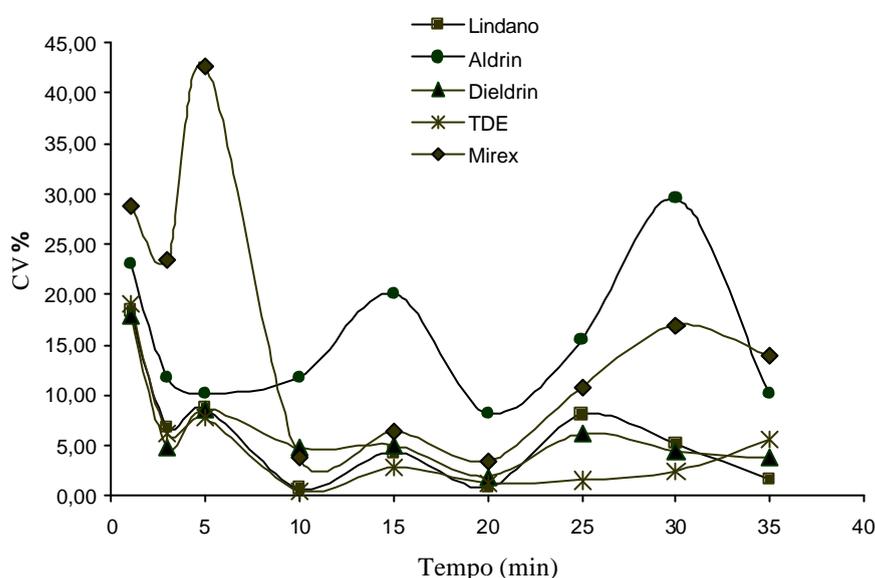


Figura 19-A: Gráfico representativo dos valores dos coeficientes de variação relativos para cada agrotóxico organoclorado obtidos em cada tempo de extração, em solução-amostra de água fortificada a 10 ng/mL (PDMS 100 μ m ; $t_D = 120$ s (250°C); agitação 1.200 rpm)

De acordo com a literatura consultada, o tempo necessário para a extração dos agrotóxicos organoclorados entrar no equilíbrio é de cerca de 60 minutos (t^∞) (EISERT & LEVSEN, 1996). Mas se for analisar a tendência da curva obtida no presente estudo (**Figura 19**), provavelmente, um valor superior a 70-80% da quantidade, que seria extraída no equilíbrio, foi extraída nos primeiros 20% do tempo necessário para o alcance do equilíbrio. Isto está em acordo com os dados de Eisert & Levsen (1996).

Uma extração onde $t_E = t^\infty$, facilita a repetitividade e a exatidão dos resultados (EISERT & LEVSEN, 1996). Mas no presente estudo, um $t_E < t^\infty$ levou a excelentes respostas, pois cada t_E foi experimentalmente controlado com precisão, através de cronômetro digital, visando maior repetitividade e exatidão dos resultados.

Através das **Figuras 19 – B e 19 – C**, observa-se que o Lindano nos primeiros minutos foi o que mais foi extraído e nos tempos a partir de vinte minutos ele e, mais ainda, o Mirex foram os agrotóxicos menos eficientemente extraídos na amostra de água fortificada. O comportamento dos agrotóxicos é em grande parte influenciados pelas características físicas e químicas dos compostos.

Na **Tabela 13**, as principais características físicas dos agrotóxicos estudados são apresentadas.

Tabela 13 Propriedades físicas dos agrotóxicos estudados

Composto	Fórmula Empírica	Mol (g/mol)	Solubilidade ^(a)	$K_{F/A}$ ^(b) (x 10 ⁴)	$K_{O/A}$ ^(c) (x 10 ⁴)	log $K_{O/A}$
Lindano	C ₆ H ₆ Cl ₆	291	7,0	1,30	0,50	3,70
Aldrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	365	0,02	1,00	316	6,50
DDE	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	318	0,05	1,00	324	6,51
Dieldrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	381	0,18	2,50	251	6,40
TDE	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	320	0,13	–	105	6,02
Mirex	C ₁₀ Cl ₁₂	546	0,19	–	20	5,30

(a) Solubilidade média em água (mg/mL)

(b) $K_{F/A}$ = coeficiente de partição fibra PDMS/água (expressa a afinidade pela fibra)

(c) $K_{O/A}$ = Coeficiente de partição octanol/água (expressa a lipossolubilidade)

Fonte: Magdic & Pawliszyn (1996); Toxnet (2004)

Nas **Figuras 19-B e 19-C**, pode-se observar com mais detalhes, em cromatogramas, o comportamento dos agrotóxicos, em alguns dos tempos de extração estudados.

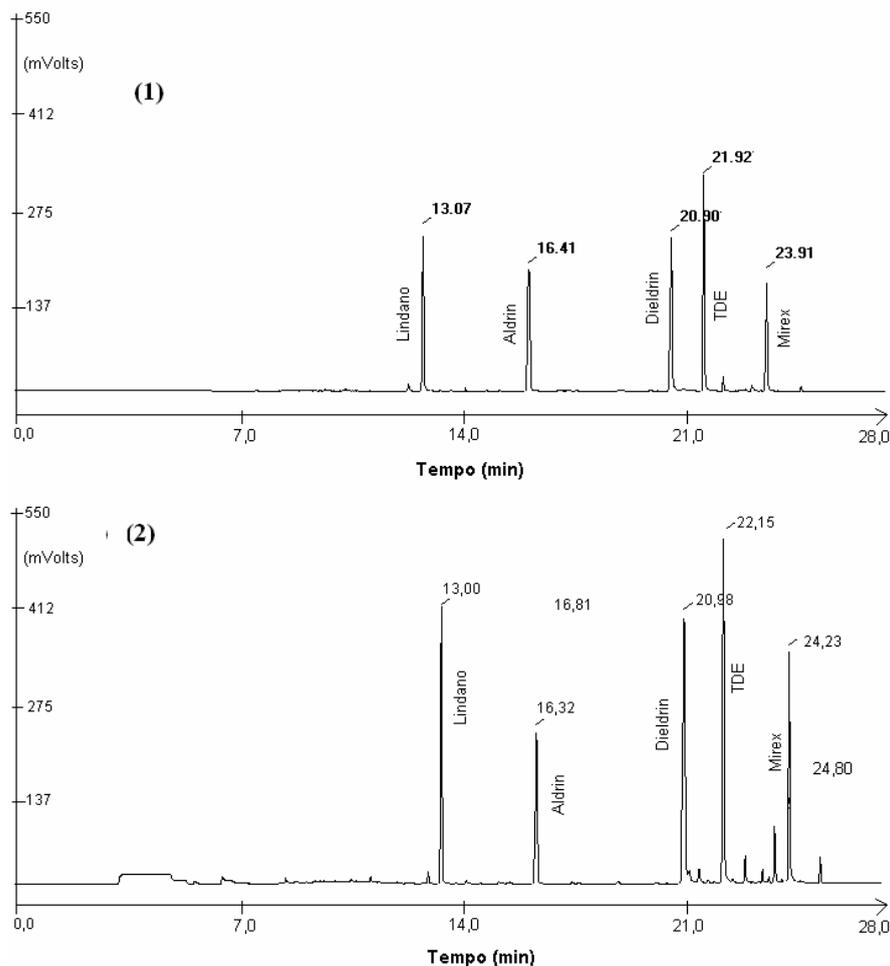


Figura 19–B: Cromatogramas MEFS-ID/CGAR/DCE para agrotóxicos na solução-amostra de água fortificada (10 ng/mL) com extração em PDMS-100 e $t_D = 120$ s (250°C): no superior o $t_E = 1$ min e no inferior = $t_E = 15$ min

Uma vez que a fibra PDMS possui caráter apolar, o comportamento do Lindano, que no presente experimento foi observado, já era esperado, pois este analito é o mais polar de todos estudados (**Tabela 13**).

Para o Mirex, a deficiência na extração, em todos os tempos, não é explicada, pois isto se contrapõe à sua alta lipossolubilidade e baixa solubilidade na água. Uma provável explicação para este efeito pode estar em seu volume molar, que em relação ao dos outros é maior. O mol do Mirex tem um volume (V) de 302 \AA^3 seguido do Dieldrin (243 \AA^3), Lindano (182 \AA^3), o de tamanho menor. O processo de adsorção do Mirex foi adversamente afetado, provavelmente, pelo tamanho da molécula, o que vai de encontro com o que Tuduri *et al.* (2001) verificaram.

Outra explicação que pode ser dada é que se for considerado que o coeficiente de difusão é função do tamanho e forma da molécula, e da resistência à ficção oferecida pela viscosidade do solvente. Para moléculas de formato esférico, o coeficiente de difusão é inversamente proporcional ao seu raio e também inversamente proporcional ao cubo da raiz do peso da molécula. O coeficiente de difusão é definido como a quantidade de soluto difundindo por segundo através de uma superfície de área de 1cm^2 quando o gradiente de concentração é de uma unidade (LEHNINGER, 1990).

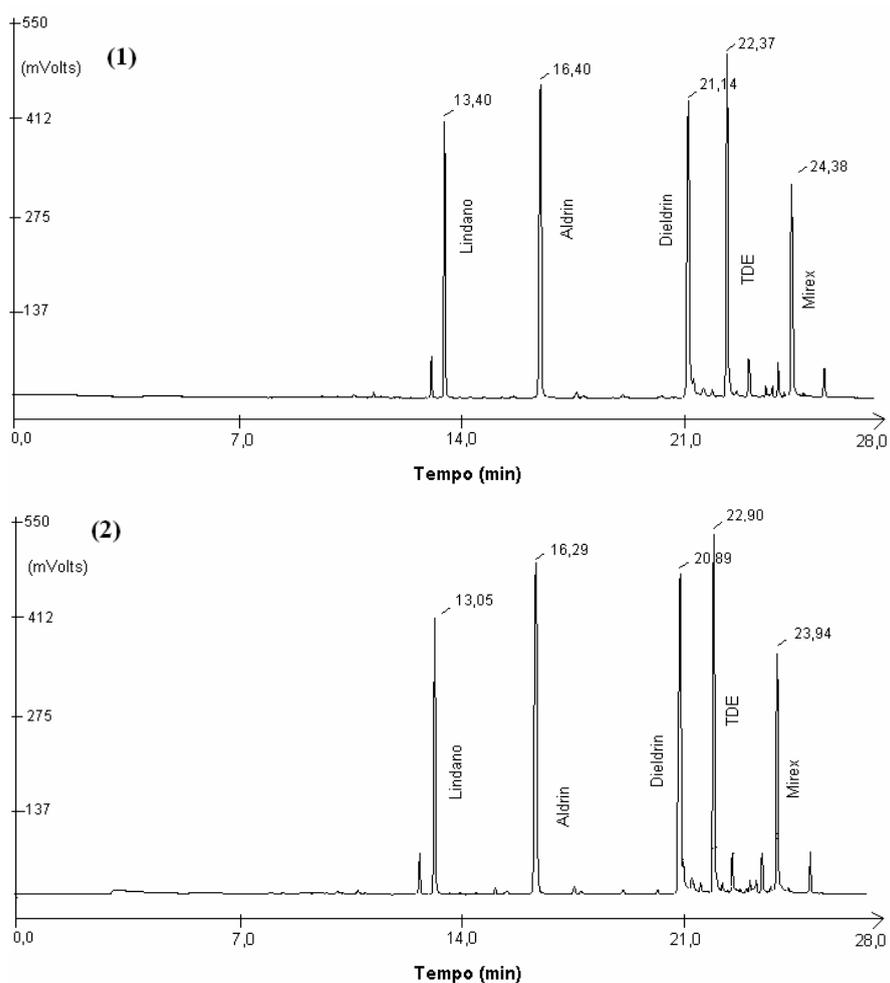


Figura 19 – C: Cromatogramas MEFS-ID/CGAR/DCE para agrotóxicos na solução-amostra de água fortificada (10 ng/mL) com extração em PDMS-100 e $t_D = 120$ s (250°C): no superior o $t_E = 20$ min e no inferior = $t_E = 35$ min

Para os mais lipofílicos, Aldrin, Dieldrin e TDE (**Figuras 19, 19-B e 19-C**) os resultados foram de encontro ao esperado. Os compostos lipofílicos possuem altos $K_{O/A}$ e, assim, espera-se que os mesmos, ao serem extraídos por polímeros apolares, possam ser determinados com eficiência obtendo-se baixos limites de detecção.

Beltran e colaboradores (1998) também observaram o mesmo efeito, pois os pesticidas estudados pela equipe mostraram diferenças em seus comportamentos, quando submetidos à micro-extração. Eles observaram que os compostos com altos $\log K_{O/A}$ (maior do que 3,8) foram mais extensivamente adsorvidos no equilíbrio, quando usou a fibra de PDMS, devido às altas afinidades com a mesma.

(b) Estudo do tempo de extração em amostra de alface

Como no item anterior, a determinação do tempo de extração ideal foi realizada por comparação das áreas obtidas em alíquotas de 15,00 mL de solução-amostra 2.

O ponto de partida neste experimento, no entanto, foi a partir de 15 minutos, tomando como base o experimento realizado com a água.

Foram realizados estudos nos tempos de extração de 15 ; 20 e 25 minutos. As outras condições não mudaram: fibra PDMS 100 μm , sob agitação a 1.200 rpm, tempo de desorção (t_D) = 120s.

As médias das áreas obtidas, para cada agrotóxico, em cada tempo de extração avaliado foram plotadas para elaboração de gráfico (**Figura 20**).

Ocorreu um aumento nas médias das áreas (**Figura 20**) com o aumento do tempo de extração, para todos os agrotóxicos, sendo que os acréscimos maiores nas médias ocorreram antes dos 20 minutos.

Por comparação estatística, as médias correspondentes aos tempos de 20 e de 25 minutos de extração, não foram significativamente diferentes entre si. Sendo assim, o tempo escolhido para todos os experimentos nas duas amostras foi de 20 minutos, considerando ainda o fato de neste tempo os coeficientes de variação não ultrapassarem aos 10%. Através dos coeficientes de variação das medidas, em cada tempo de extração, observou-se que ocorreu uma maior repetitividade, a partir dos 15 minutos de extração.

Antes de 15 minutos de extração, o coeficiente de variação das medidas variou de 10 a 45%, dependendo do agrotóxico e da amostra, ficando para o Mirex a maior variação.

De acordo com Dugay e colaboradores (1998), a extração tem que ser monitorada cuidadosamente, pois quando o equilíbrio não é atingido pequenas variações no tempo resultam em grandes desvios na quantidade extraída. Pawliszyn (1997) cita que medidas realizadas em tempos muito distantes do tempo de equilíbrio são as mais imprecisas.

Por comparação entre os dois tipos de amostra, água e alface, pode-se observar que na alface os sinais analíticos foram menores e com maiores coeficientes de variação, sugerindo que a matriz influencia no desempenho da extração. Grote & Pawliszyn (1997) e Simplicio & Vilas Boas (1999) explicam que a eficiência da extração dos analitos em quantidades traço pode ser afetada por outro composto que possa estar presente em muito maior quantidade na amostra.

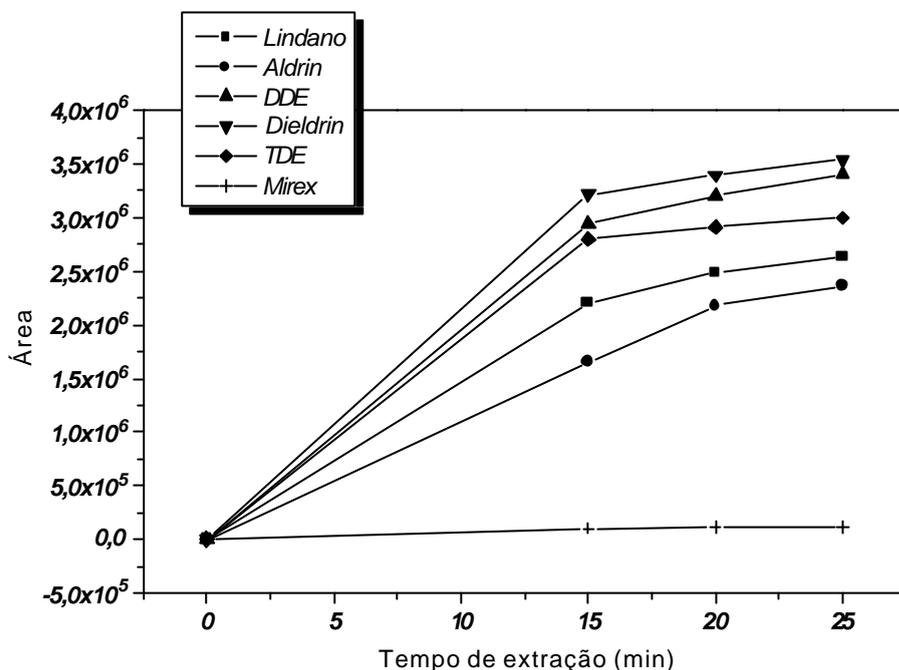


Figura 20 Influência do tempo de extração (min) na micro-extração dos agrotóxicos estudados, em extrato aquoso de alface fortificado a 10 ng/mL (PDMS 100 μ m; t_D = 120s (250°C); agitação 1.200 rpm).

Ao comparar o comportamento do Lindano, em ambas amostras, observa-se nas **Figuras 19 e 20**, que na alface este composto não se comportou como o agrotóxico menos lipofílico, entre todos estudados, indicando mais uma vez que o efeito da matriz pode estar presente.

(c) Conclusões sobre o tempo de extração

A etapa de extração é uma etapa muito importante para a eficiência da micro-extração, por isto seus parâmetros devem ser cuidadosamente controlados.

Para cada matriz uma otimização tem que ser realizada.

Para matrizes não gordurosas, como as hortaliças folhosas, a água pode servir como ponto de partida para a otimização, o que aumentará a vida útil da fibra.

Na **Figura 20-A**, para efeito ilustrativo, os cromatogramas estão presentes.

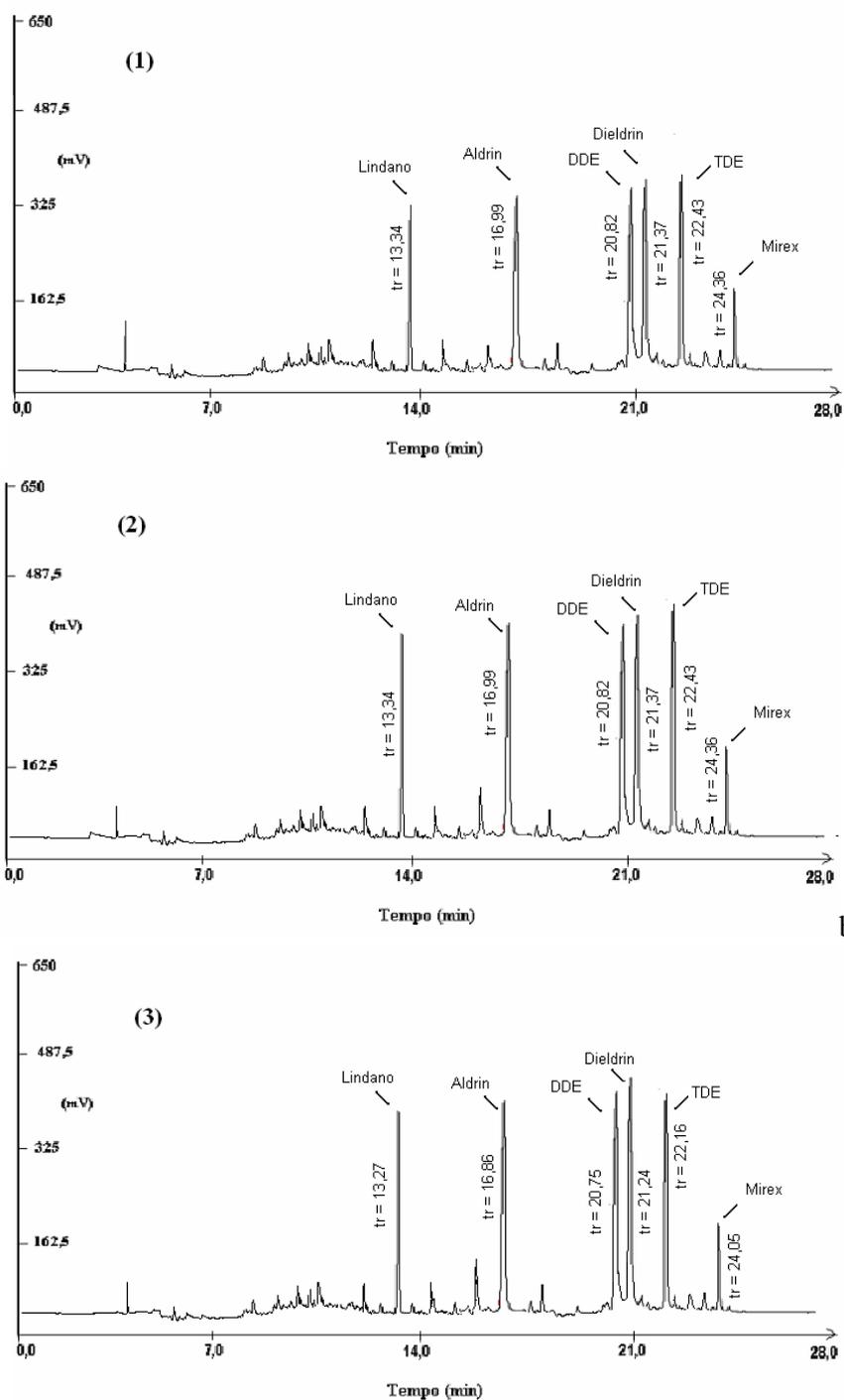


Figura 20-A: Cromatogramas de análise por MEFS-ID/CGAR/DCE de agrotóxicos na solução - amostra de extrato aquoso de alface fortificada (10 ng/mL) com extração por PDMS-100 sob agitação a 1.200 rpm com $t_D = 120$ s, em diversos tempos t_E : (1) 15 min; (2) 20 min; (3) 25 min

3.1.3.4 Estudo da influência da força iônica sobre a micro -extração de agrotóxicos

Vários estudos são encontrados sobre a influência positiva exercida pela força iônica, através da adição de sal (NaCl ou Na₂SO₄), sobre a extração de compostos orgânicos de soluções aquosas por MEFS. Baseado neste fato, possíveis efeitos resultantes da adição de NaCl, sobre a extração de agrotóxicos por MEFS-ID com agitação, foram avaliados nas amostras de água e de alface fortificados, comparando-se as médias dos sinais analíticos obtidos em situações onde foram realizadas adições variadas de sal em concentrações na faixa de 0% a 30% (m/v) e após a saturação também. Foram aplicados os tempos de extração e de dessorção previamente otimizados.

(a) Estudo do efeito da força iônica na amostra de água fortificada

O efeito da força iônica sobre a micro-extração foi estudado em amostras de água fortificadas (**solução-amostra 1**) nas seguintes concentrações de sal: 0; 5; 15; 30% (m/v) e saturada.

Em cada 15,00 mL destas soluções a fibra foi imersa com $t_E = 20$ min e agitação de 1.200 rpm, seguindo para dessorção em $t_D = 120s(250^\circ C)$.

As médias das áreas obtidas, para cada agrotóxico, em cada concentração de sal, foram registrada sobre a forma de gráfico, para efeitos comparativos.

A representação dos dados pode ser observada na **Figura 21**.

Como pode ser observado na **Figura 21**, os resultados indicam que a adição de sal favoreceu consideravelmente a extração de alguns agrotóxicos e de outros não. Em relação aos favorecidos, a elevação da força iônica fez diminuir a solubilidade em água melhorando a sensibilidade na partição entre o analito e a fase estacionária. Este efeito *salting* é específico para cada composto. Trabalhando com herbicidas, Krutz e colaboradores (2003), observaram que a eficiência da extração diminuía para alguns compostos quando a força iônica aumentava e para outros, nenhuma melhora era observada.

Ainda observando a **Figura 21**, a adição de sal resultou em efeitos positivos na extração do Lindano e, em maior extensão, na do Mirex (apesar deste ser menos polar do que Lindano), cujo comportamento será discutido mais adiante.

A extração do Lindano, em comparação com a solução original (isenta de sal), foi aumentada em todas as concentrações de NaCl usadas, representando uma elevação máxima de 159%, quando a solução com 30% m/v foi usada, não melhorando com a saturação.

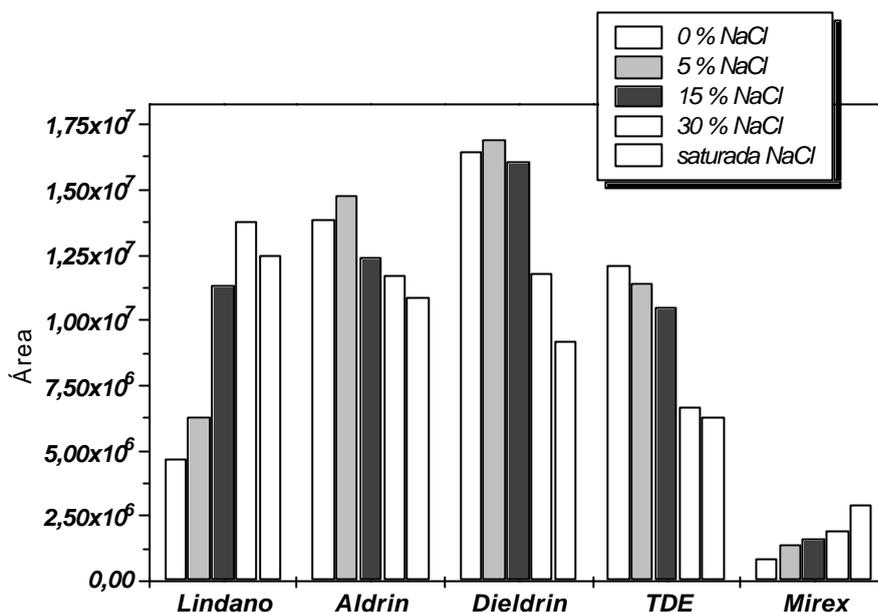


Figura 21 Média das áreas obtidas para cada agrotóxico extraído na amostra de água fortificada (10 ng/mL), com adições de NaCl: 0; 5; 15; 30 % (m/v) e saturada, com extração por PDMS-100 sob agitação a 1.200 rpm com $t_E = 20$ min e $t_D = 120$ s (250°C)

O aumento da força iônica da solução, promovendo a migração do Lindano para a outra fase (a fibra no caso) foi um fato esperado. Este analito possui polaridade (embora fraca) que admite uma certa solubilidade em água (**Tabela 13**).

Conforme dados da literatura, há uma significativa melhora na extração, na presença de sal, quando o analito possui uma certa solubilidade em água e dela necessita ser extraído por outra fase menos polar que a água. Com o aumento da força iônica a solução aquosa adquire maior polaridade, dificultando a solubilização dos analitos fracamente polares no meio salino. Isto fez com que a saída Lindano para a fibra fosse forçada, aumentando em consequência, o coeficiente de partição do analito entre a fase extratora (fibra) e a solução aquosa (fase extraída).

Magdic & Pawliszyn (1996) mencionam que quanto maior for a solubilidade do analito em água, menor é a sua afinidade pelo revestimento da fibra (PDMS). Então, a quantidade de analito extraída pela fibra pode ser aumentada se a sua solubilidade em água for diminuída, o que normalmente ocorre quando se aumenta a força iônica, pela adição de sal à matriz. Os autores verificaram na execução de seus experimentos que o Lindano teve seu sinal aumentado com a adição de NaCl de 10 a 40% (m/v). Segundo Beltran e colaboradores (1998), o efeito *salting out*, devido a adição de sal, facilita a extração dos

mais polares, mas geram variados efeitos dependendo das características de cada pesticida (principalmente da solubilidade que possuem em sistemas aquosos)

Desde o início dos experimentos, após comparações entre o comportamento do Lindano e dos outros agrotóxicos, observou-se que apesar de apresentar um valor $K_{O/A}$ relativamente baixo (**Tabela 13**), não foi o que apresentou o menor $K_{F/A}$. Em outras palavras, apesar de ser o o menos lipossolúvel (uma polaridade maior que o restante), não foi o menos extraído, como esperado.

Este fato se contrapõe a alguns da literatura, pois de acordo com Tuduri e colaboradores (2001) é bem estabelecido que o coeficiente de partição octanol/água ($K_{O/A}$), além de representar a lipossolubilidade de uma substância, serve para estimar, em proporção direta, a sua afinidade pela fibra PDMS. Então, valores baixos de $K_{O/A}$ resultariam em baixos $K_{F/A}$, para a fibra PDMS (o que não ocorreu com o Lindano).

Na **Tabela 13**, pode-se verificar que valor de $K_{F/A}$ ($1,30 \times 10^4$) do Lindano é semelhante ao do Aldrin e do DDE (os mais lipossolúveis dos seis agrotóxicos estudados).

Este comportamento, relativa afinidade pela fibra contapondo-se a uma certa polaridade, provavelmente se deve a conformação estrutural e o peso molecular do Lindano favorecendo a sua adsorção pela fase estacionária.

Ainda na **Figura 21**, observa-se que para o Aldrin, Dieldrin e para o TDE, não ocorreu diferença significativa entre 0 e 15% (m/v) de sal.

Na solução contendo 30 % (m/v), ao contrário do que ocorreu com o Lindano e com o Mirex, verificou-se um efeito negativo significativo na extração destes três agrotóxicos. Em relação à solução original, a queda nas extrações do Aldrin, Dieldrin e do TDE foi de 18, 29 e de 42%, respectivamente, sendo o Aldrin o menos prejudicado e o TDE o mais sensível ao efeito adverso do sal a 30% (m/v).

Na saturação, verificou-se tendência semelhante para estes três, ocorrendo uma queda de 22, 40 e de 44%, seguindo a sequência anterior.

Estes resultados coincidem com os de Magdic & Pawliszyn (1996) que verificaram, na execução de seus experimentos, que com a adição de NaCl de 10 a 40% (m/v) a extração do Aldrin, Dieldrin e DDE foi reduzida. Estes compostos são, entre os estudados, os mais lipofílicos.

Aguilar e colaboradores (1999) trabalhando com força iônica verificaram que a adição de sal fez diminuir as recuperações dos organoclorados.

Para o Mirex, assim como ocorreu com o Lindano, houve uma tendência de aumento do sinal em todas as concentrações de NaCl, em relação à solução original, com uma elevação máxima de 249%, obtida com a saturação de sal (o Mirex foi o único que teve extração favorecida pela saturação de sal, entre todos).

Na **Tabela 5** pode ser observado que o Mirex e o TDE possuem semelhantes solubilidades em água, o que indica que ambos deveriam possuir tendências semelhantes em relação ao octanol. Mas o que ocorre não foi o esperado, pois o Mirex apresenta maior dificuldade em se solubilizar no octanol do que o TDE (cerca de cinco vezes). Este fato mostra que a estrutura do Mirex dificulta a sua solvatação pelo octanol e, do mesmo modo, a sua solubilidade. Uma analogia pode ser feita com a fibra, como provável explicação para esclarecer a dificuldade em ser adsorvido.

Além disso, os resultados obtidos desde o início da otimização, no presente trabalho, vem mostrando sempre que o Mirex apresenta pouca propriedade em ser extraído pela fibra, indicando que o valor de $K_{F/A}$ do Mirex é bem menor do que os de todos, apesar de ter $K_{O/A}$ maior do que a do Lindano e próximo ao do TDE.

Todos estes fatos indicam que o Mirex pode, provavelmente, estar insolubilizado na água sob a forma de micelas de grande peso molecular, microscopicamente precipitadas na solução. Em outras palavras, se não fosse a aglomeração de suas partículas, o Mirex poderia ser um pouco mais solúvel em água, estar um pouco mais disperso e mais propenso a ser extraído, tal como é o Lindano. Sob a forma de micelas, porém, a sua difusão se tornaria mais lenta e a adição de sal provocaria, então, a fragmentação das micelas, tornando-as mais dispersas na solução, facilitando o transporte para a fibra.

A questão da pouca dispersão em água, porém, parece não ser o único fator, uma vez que a adição de sal favoreceu a extração do Mirex, mas não o suficiente para que o mesmo adquirisse um bom desempenho, continuando a ser pouco extraído, em relação aos outros. Provavelmente, ao contrário do Lindano, seu alto peso molecular e conformação estrutural podem ter sido outros fatores adversos à sua extração. De acordo com Tuduri e colaboradores. (2001), quanto maior for a linearidade da cadeia carbônica, mais favorecida será a extração da molécula.

Segundo Dugay e colaboradores (1998), não basta somente correlacionar $K_{F/A}$ e os de $K_{O/A}$ para prever o comportamento das substâncias. Estas correlações têm que ser observadas, principalmente, dentro de um grupo de substâncias relativamente homogêneo (mesma série homóloga). Assim, o mesmo deve ser considerado em relação à solubilidade do analito em água, quando compostos com diferentes funções são comparados.

Através dos experimentos variados verificou-se que a solubilidade e a lipossolubilidade não são suficientes para explicar as afinidades observadas. As razões para os baixos e inesperados sinais do Mirex requerem investigações adicionais.

Com todos os agrotóxicos foi observado que a presença de sal a 5%, não resultou em diferenças significativamente diferentes da solução original, não justificando o seu uso nesta concentração.

Comparando os tempos de retenção dos agrotóxicos estudados extraídos por MEFS para cada adição ou não de NaCl, observou-se que a mudança de meio, isto é, da força iônica, não provocou um deslocamento do pico característico de cada agrotóxico. Isto indica que a adição de sal não mudou a seletividade, ocorrendo, no entanto, a produção de um cromatograma menos limpo, devido a impurezas antes não detectadas, como pode ser observado nas **Figura 22**.

No cromatograma (1) da **Figura 22** são apresentados os picos característicos dos agrotóxicos estudados extraídos da água fortificada original e no cromatograma (2) são apresentados os picos da mesma amostra após saturação com NaCl. Observa-se neste último o aparecimento de um pico estranho e aumento de outros.

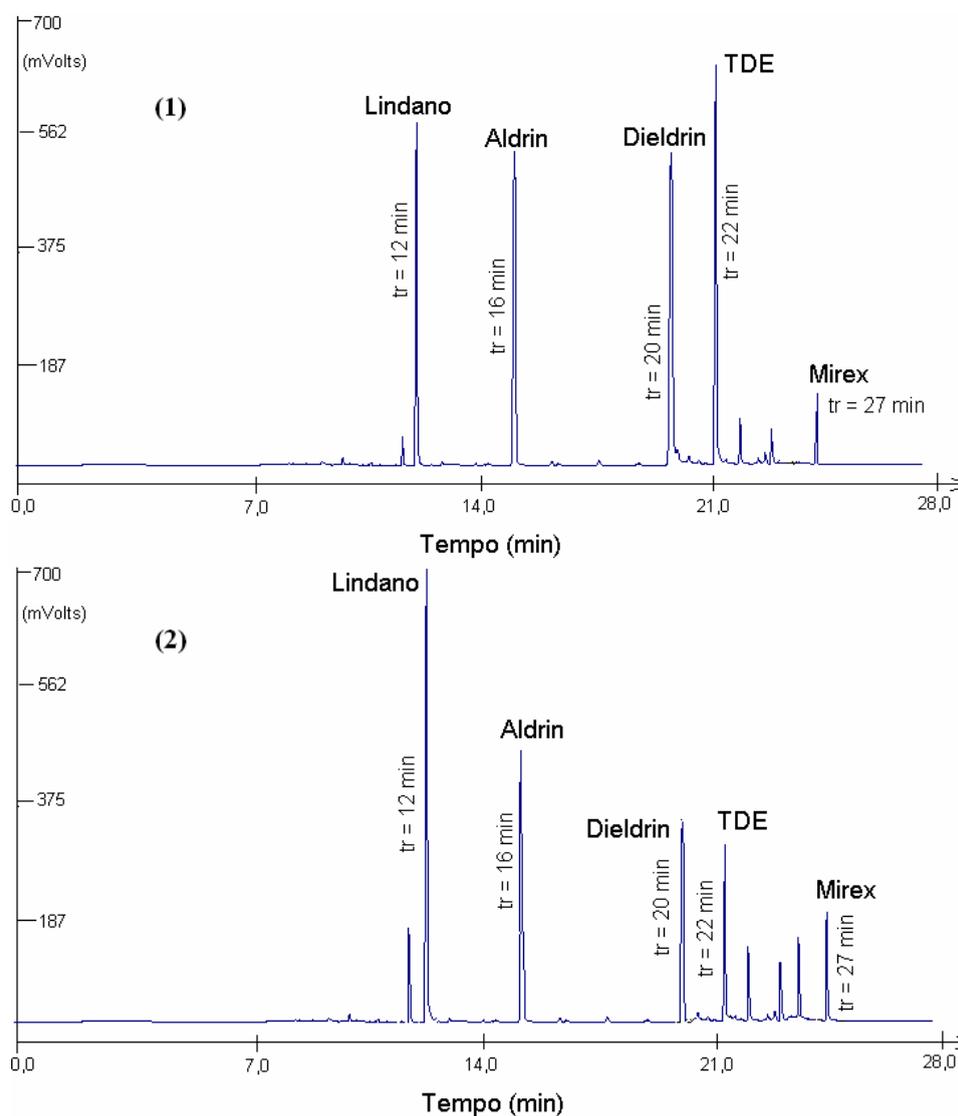


Figura 22 :Cromatogramas de análise por MEFS-ID/CGAR/DCE de agrotóxicos na solução-amostra de água fortificada (10 ng/mL) com extração por PDMS-100 sob agitação a 1.200 rpm com $t_E = 20$ min e $t_D = 120$ s (250° C). (1) Sem NaCl; (2) Saturada com NaCl

(b) Estudo do efeito da força iônica na amostra de alface

O efeito da força iônica sobre a micro-extração foi também estudado em amostra de alface (**solução-amostra 1**), mas nas seguintes concentrações de sal: 0; 15; 30% (m/v) e saturada, já que a concentração de 5% não teve impacto sobre a micro-extração.

Tal como ocorreu no item anterior, em cada 15,00 mL destas soluções a fibra foi imersa com $t_E = 20$ min e agitação de 1.200 rpm, seguindo para dessorção em $t_D = 120$ s (250°C).

As médias das áreas obtidas, para cada agrotóxico, em cada concentração foram registradas sobre a forma de gráfico, encontrando-se na **Figura 23**.

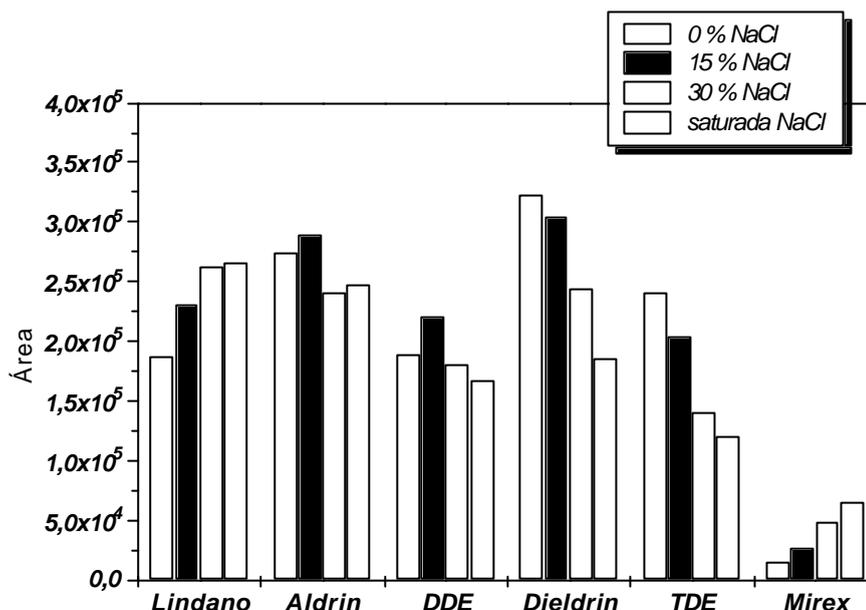


Figura 23 Média das áreas obtidas para cada agrotóxico extraído do extrato aquoso de alface fortificada (10 ng/mL), com adições de NaCl: 0; 15; 30 % (m/v), com extração por PDMS-100 sob agitação a 1.200 rpm com $t_E = 20$ min e $t_D = 120$ s (250°C)

O experimento com NaCl no extrato de alface, representado na **Figura 23**, mostra a mesma tendência para o comportamento dos agrotóxicos extraídos da alface comparada à água. Como por exemplo, houve aumento do sinal analítico para o Lindano, em todas as concentrações de NaCl usadas, ocorrendo um acréscimo máximo de 47%.

Para o TDE, a adição de NaCl provocou uma queda no sinal, em qualquer concentração de sal adicionado. Como outro exemplo, o Mirex apresentou um aumento no sinal em todas as concentrações de NaCl, representando este aumento em 298% quando se usa uma solução saturada em NaCl em relação à solução sem NaCl.

(c) Conclusões sobre a adição de sal

Para diminuir o limite de detecção de analitos lipossolúveis fracamente polares, como é o caso do Lindano, vale a pena aumentar a força iônica da solução onde a micro-extração vai ser realizada.

No caso do Mirex, investigações adicionais sobre o seu comportamento merecem atenções especiais.

Para a análise de multiresíduos preferiu-se trabalhar sem a modificação da força iônica.

3.1.3.5 Estudo do efeito do pH sobre a micro-extração de agrotóxicos

A alteração do pH do meio, dependendo da natureza do analito, pode torná-lo menos solúvel na água facilitando a sua extração por MEFS.

Com a diminuição do pH, analitos de natureza ácida tenderão a formar moléculas não-dissociadas que são mais insolúveis em água e por isto mais extraíveis pela fibra PDMS, de natureza lipofílica.

Com a elevação do pH o mesmo ocorre com os analitos de natureza básica.

(a) Estudo em solução-amostra de água fortificada

Os efeitos da variação do pH sobre a eficiência da extração foram estudados preparando-se as soluções fortificadas (**solução-amostra 1**) acidificando-as com ácido clorídrico ou alcalinizando-as com NaOH.

Foram realizados estudos em valores de pH de 4 ; 6 ; 7 e 9, e extração com fibra PDMS 100 μm , tempo de extração (t_E) = 20 min, sob agitação a 1.250 rpm e tempo de dessorção (t_D) = 120s (250°C). A solução-amostra fortificada apresentou originalmente um pH = 6,0.

As médias das áreas obtidas, para cada agrotóxico, em cada concentração de sal, foram registradas sobre a forma de gráfico, para efeitos comparativos.

A representação dos dados pode ser observada na **Figura 24**.

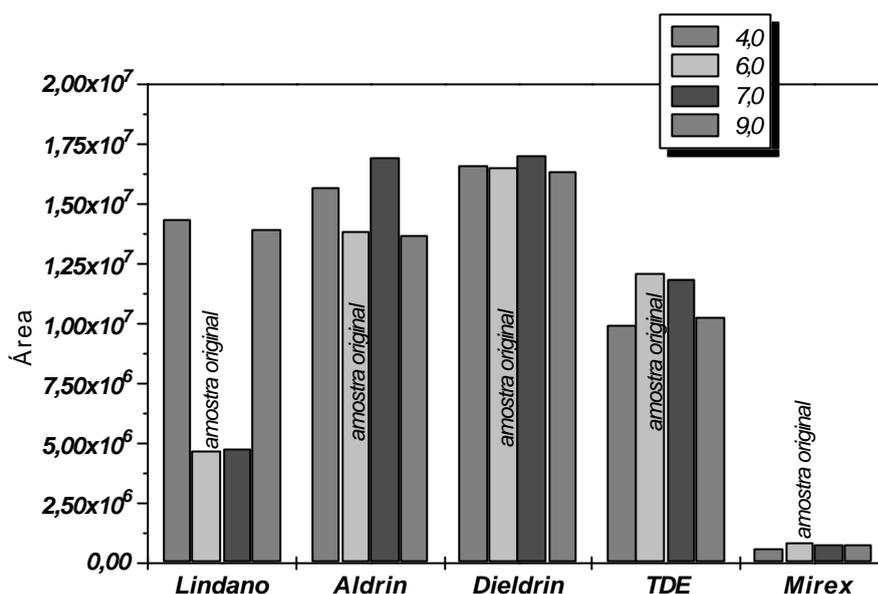


Figura 24 Média das áreas obtidas para cada agrotóxico extraído da solução-amostra de água fortificada (10 ng/mL) em diferentes valores de pH: 4; 6; 7 e 9 (PDMS 100 μ m ; t_E = 20 min, sob agitação, por 1.200 rpm ; t_D = 120s a 250°C)

Na **Figura 24**, pode ser observado que o Lindano apresentou um considerável aumento de sinal – em relação à amostra original – tanto em pH 4 quanto em pH 9, sendo esta variação de aproximadamente 290%. Este agrotóxico não apresentou diferença significativa entre os valores de pH 6 e 7, e entre os de 4 e 9. O inesperado comportamento do Lindano merece atenção para estudos posteriores.

Os outros agrotóxicos não apresentaram diferença significativa nas médias das áreas obtidas em todos os valores de pH. Zambonin e colaboradores (2004) verificaram os mesmos efeitos.

Diante deste resultado, optou-se por trabalhar no pH da amostra original, a fim de evitar que ocorra a contaminação pela introdução de reagentes (HCl ou NaOH, no caso) e a diminuição da vida útil da fibra.

O pH é um parâmetro físico-químico importante para compostos com maior acidez ou basicidade, pois a extração é mais efetiva se não estiverem dissociados. De acordo com Prosen & Zupancic-Kralj (1999), alguns cuidados devem ser tomados com relação à fibra de PDMS, pois este tipo de material não é resistente a pH menor que 4 e maior que 10.

Na **Figura 24-A** a seguir, pode-se observar através de cromatograma o efeito da mudança de pH.

Nos cromatogramas, observa-se que o Lindano em pH = 4,0 e 9,0 (onde as médias de suas áreas foram significativamente maiores do que em pH neutro e 6,0) os tempos de retenção foram aumentados. Isto indica uma provável mudança de polaridade com o pH.

A elevação da afinidade do Lindano pela fibra, resultou em aumento da área extraída. Estudos mais específicos devem ser realizados, a fim de esclarecer o ocorrido (aumento de 1 minuto no tempo de retenção – de 13,20 para 14,20 min).

Na análise de alimentos ácidos como frutas e sucos de frutas, certamente a detecção do Lindano será favorecida. Mas em amostras com valores de pH de 6,0 a 7,0 como ocorre em amostras de água (dependendo da origem) para melhor detecção da lindano o seu pH deverá ser corrigido para 4,0 ou 9,0.

Ainda na Figura 24-A, pode-se observar que no tempo de retenção próximo a 14 minutos, um pico estranho apareceu. Pode ser alguma impureza ou degradação de algum dos analitos.

Para um estudo simultâneo de agrotóxicos – análise de multi-resíduos – a melhor opção foi trabalhar com amostra no estado original – sem alterar o pH e a força iônica.

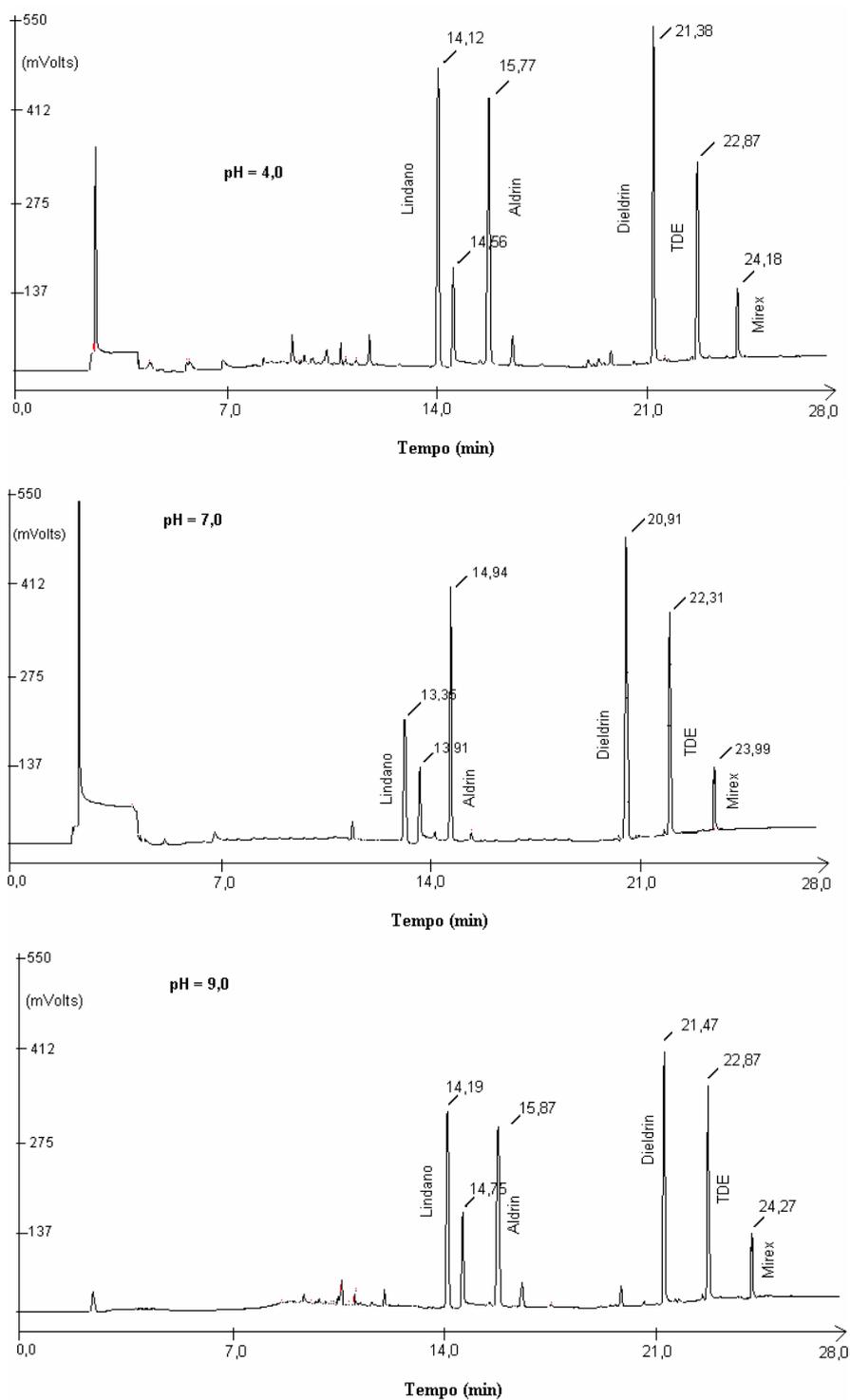


Figura 24-A Cromatogramas de análise por MEFS-ID/CGAR/DCE de agrotóxicos na solução-amostra de água fortificada (10 ng/mL) com extração por PDMS-100 sob agitação a 1.200 rpm com $t_E = 20$ min e $t_D = 120$ s (250° C), em pH = 4,0, 7,0 e 9,0

(b) Estudo do efeito do pH na amostra de alface

Como no item anterior, os efeitos da variação do pH sobre a eficiência da extração foram estudados, mudando a matriz para alface. Os extratos aquosos de alface (**solução-amostra 2**) tiveram os valores de pH de 4 ; 6 ; 7 e 9 corrigidos.

A extração foi realizada também, como no item anterior, com fibra PDMS 100 μm , tempo de extração (t_E) = 20 min, sob agitação a 1.250 rpm e tempo de dessorção (t_D) = 120s (250°C). A solução-amostra apresentou originalmente um pH = 6,5

As médias das áreas obtidas, para cada agrotóxico, em cada valor de pH estudado foram registradas sobre a forma de gráfico representado na **Figura 25**.

Na **Figura 25**, observa-se que, embora com sinal analítico dez vezes menor que o obtido em amostra de água, em todos os valores de pH, o comportamento de todos os agrotóxicos foram os mesmos comparados aos obtidos em amostra de água.

Vale lembrar que esta mesma tendência foi encontrada ao se estudar a mudança da força iônica do meio: as duas amostras (água e alface) apresentaram o mesmo comportamento com relação à força iônica e ao pH para todos os agrotóxicos. Este fato mais uma vez constata que o efeito da matriz (partículas de alface em suspensão, no caso) recai mais na quantidade extraída de agrotóxico do que no seu perfil de comportamento. Isto é importante na fase da aplicação da MEFS para quantificação, o que certamente exigirá uma curva de adição padrão. Com ela o efeito da matriz é minimizado.

Considerando os resultados obtidos referentes às influências que a força iônica e o pH exerceram, sobre a extração de todos os agrotóxicos, nas condições deste experimento, verificou-se que estes procedimentos não resultaram em vantagens apreciáveis, adicionando-se ainda o fato da inclusão de impurezas no meio.

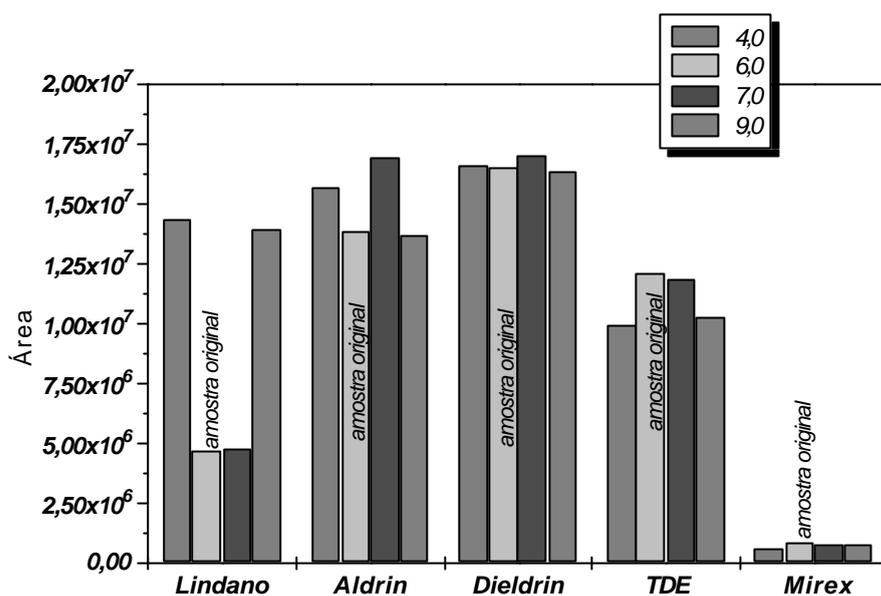


Figura 25 Média das áreas obtidas para cada agrotóxico extraído da solução-amostra de água fortificada (10 ng/mL) em diferentes valores de pH: 4; 6; 7 e 9 (PDMS 100 μ m ; t_E = 20 min, sob agitação, por 1.200 rpm ; t_D = 120s a 250°C)

Na **Figura 26** o resultado deste estudo pode ser visualizado em cromatograma.

(c) Conclusões

Para pesquisa de Lindano vale a pena corrigir o pH da matriz para 4,0 ou 6,0, para diminuir o limite de detecção.

Para análise multi-resíduo a correção do pH não foi considerada um procedimento de significada importância.

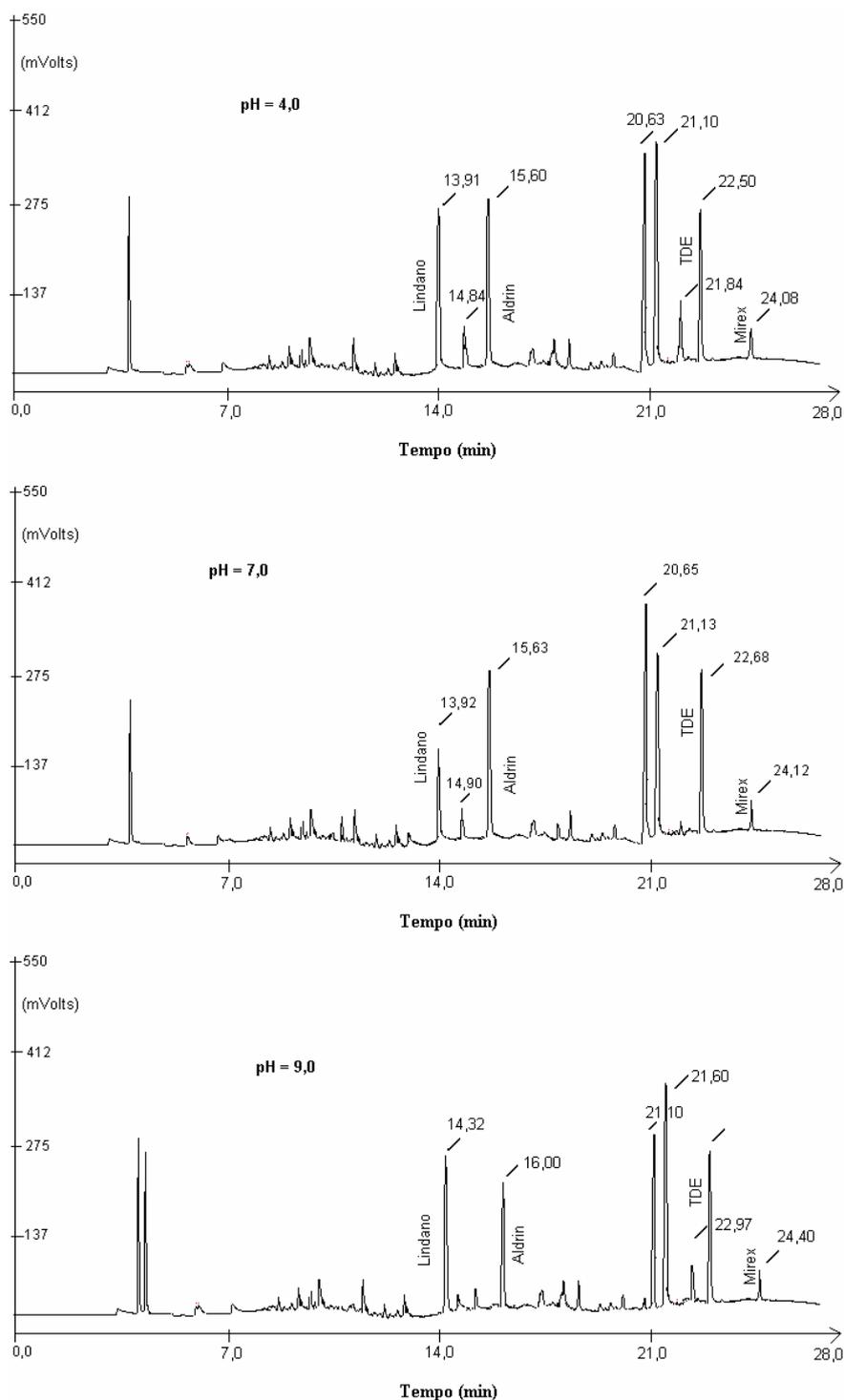


Figura 26 :Cromatogramas de análise por MEFS-ID/CGAR/DCE de agrotóxicos na solução-amostra de água fortificada (10 ng/mL) com extração por PDMS-100 sob agitação a 1.200 rpm com $t_E = 20$ min e $t_D = 120$ s (250° C), em pH = 4,0, 7,0 e 9,0

4 CONCLUSÕES

- 1) Cada operador deve estabelecer através de testes experimentais qual o melhor comprimento da agulha que deve ser usado para aumentar a eficiência da dessorção, sendo que isto vai depender do modelo de cromatógrafo e das dimensões do *liner* usado.
- 2) Condicionar a fibra foi essencial para a retirada de impurezas.
- 3) Como prática de rotina, entre as extrações realizadas por MEFS, a fibra deve ficar imersa na água ultrapura sob agitação, para obtenção de melhores resultados.
- 4) Os tempos de retenção obtidos para os agrotóxicos estudados, após injeção convencional de solução-padrão e após MEFS na solução-amostra, foram semelhantes, obtendo se coeficientes de variação satisfatórios.
- 5) Tempos entre 120 e 240 segundos a 250°C asseguraram dessorções máximas.
- 6) MEFS-ID, no modo dinâmico, favoreceu o desempenho da extração, aumentando as quantidades extraídas de analito e diminuindo os coeficientes de variação.
- 7) Entre as velocidades estudadas, a de 1.200 rpm (velocidade máxima) foi a que proporcionou maior sinal analítico e menores coeficientes de variação.
- 8) Tempos de extração a partir do 15 min, sob agitação a 1.200 rpm, mostraram assegurar bons resultados com os menores coeficientes de variação.
- 9) Para prever, a afinidade do Mirex pela fibra PDMS, somente o valor de $K_{O/A}$ não foi eficaz, necessitando de outros dados, como conformação espacial da molécula, massa molar e suas interações com a água e a fibra.
- 10) O comportamento adverso do Mirex frente à extração, tanto na presença de sal quanto na ausência, nas condições do experimento merece atenção e estudos adicionais.
- 11) O aumento da força iônica não foi positivo para o Aldrin, DDE, Dieldrin e TDE, mas favoreceu a extração do Lindano (o menos lipofílico entre todos estudados) e a do Mirex (lipofílico).
- 12) O aumento da força iônica ou alteração do pH para 4 ou 9, favorecendo a extração do Lindano, pode ser indicada para diminuir o seu limite de detecção.
- 13) O comportamento inesperado do Lindano frente à extração em valores de pH ajustados para 4,0 e para 9,0 deve ser averiguado com mais rigor.
- 14) Para um estudo simultâneo de agrotóxicos – análise de multi-resíduos – a melhor opção foi trabalhar com a amostra no estado original – sem alterar o pH e a força iônica.
- 15) A análise dos parâmetros para o estudo da MEFS apresentou as mesmas tendências no comportamento de todos os agrotóxicos nos dois tipos de amostras (água e alface).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, A.; PEÑALVER, E.; POCURULL, E.; FERRÉ, F.; BORRULL, R.M. MARCÉ. Optimization of spme conditions using a response methodology to determine organochlorine pesticides surface methodology to determine organochlorine pesticides in water by gas chromatography and electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, v.844, n.425-432, 1999.

ARMON, A.D. *Solid phase microextraction for the analysis of flavors*. In: TECHNIQUES FOR ANALYZING FOOD AROMA, New York: Marcel Dekker, 1997, p. 81-112.

ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. SPME with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, v. 62, p. 2145 – 2148, 1990.

BELTRAN, J.; LOPEZ F.J.; CEPRIA, O.; HERNANDEZ, F. SPME for quantitative analysis of organophosphorus pesticides in environmental water samples *Journal of Chromatography*, v.808, n.1-2, p.257-263, 1998.

BOYD-BOLAND, A.; MAGDIC S.; PAWLISZYN, J. B. Simultaneous determinations of 60 pesticides in water using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst*, v. 121, p.929-938, 1996.

DEAN, J.; TOMLINSON, W. R. MAKOVSKAYA, V., CUMMING, R., HETHERIDGE, M., COMBER, M. SPME as a method for estimating the octanol-water partition coefficient. *Analytical Chemistry*, v. 68, n.1, p.130-133, 1996.

DUGAY, J.; MIÈGE, M.C.; HENNION, C. Effect of various parameters governing solid-phase microextraction for the trace-determination of pesticides in water. *Journal of Chromatography A*, v 795, p.27-42, 1998.

EISERT, R.; LEVSEN, K. SPME coupled to gas chromatography: a new method for the analysis of organics in water. *Journal of Chromatography A*, v.733, n.1-2, p.143-157, 1996.

GROTE, C.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction for the analysis of human breath. *Analytical Chemistry*, v. 69, n.4, p.587 – 596, 1997.

HONG-PING LI; GWO-CHEN LI; JEN-FON JEN Determination of organochlorine pesticides in water using microwave assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography *Journal of Chromatography A*, v.1012, n.2, p.129-137, 2003.

KRUTZ, L. J.; SENSEMAN A.; SCIUMBATO, A. S. Solid-phase microextraction for herbicide determination in environmental samples *Journal of Chromatography A*, v.999, n.1-2, p.103-121, 2003.

LAMBROPOULOU, D. A; ALBANIS, T. A Headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography–mass spectrometry for the rapid screening of organophosphorus insecticide residues in strawberries and cherries *Journal of Chromatography A*, v.223, n.1-2, p.197-203, 2003.

LEHNINGER, A.L. *The molecular basis of cell structure and function* Worth publisher Inc, 12^a edição; New York; 833p., 1990.

LOUCH, D.; MOTLAGH, S.; PAWLISZYN, J. Dynamics of organic compound extraction from water using liquid coated fused silica fibers. *Analytical Chemistry*, v.64, p.1187-1199, 1992.

MAGDIC, S.; PAWLISZYN, J. Analysis of organochlorine pesticides using SPME, *Journal of Chromatography A*, v.723, p.111-122 , 1996.

PAWLISZYN, J. *Solid phase microextraction – Theory and practice*. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1997.247p.

PROSEN, H.; ZUPANCIC-KRALJ, L. Solid-phase microextraction *Trends in Analytical Chemistry*, v.18, n.4, 1999.

QUINTEIRO, L.M.C.; NOBRE, A.L.R.; FERREIRA, A.B.B.; GODOY, R.L.O.; CASTRO, I.M. Micro-extração em fase sólida: fundamentos e aplicações em análise de alimentos. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v.21, n.1, p.1-30, 2003

SIMPLÍCIO, A. L.; VILAS BOAS, L. Validation of a SPME method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. *Journal of Chromatography A*, v.833, p.35-42, 1999.

SUPELCO, Manual de Instrução que acompanha o amostrador para MEFS, 2003.

TOXNET Data Bases [2004?] Conjunto de base de dados de toxicologia de produtos perigosos. Disponível em: <<http://www.toxnet.com.br>> Acesso em: 03 jul. 2004.

TUDURI, L.; DESAUZIERS, V.; FANLO, J.L. Potential of solid-phase microextraction fibers for the analysis of volatile organic compounds in air. *Journal of Chromatography Science*, p.521-529, 2001.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Micro-extração por fase sólida. *Química Nova*, v.23, n.4, p.523-530, 2000.

ZAMBONIN, C. G. QUINTO, M.; DE VIETRO, N.; PALMISANO, F. Solid-phase microextraction – gas chromatography mass spectrometry: A fast and simple screening method for the assessment of organophosphorus pesticides residues in wine and fruit juices. *Food Chemistry*, v.86, n.2, p.269-274, 2004.

CAPÍTULO IV

VALIDAÇÃO

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

Validação, em Análise Química, é estar com o objetivo voltado para a confiabilidade analítica do método escolhido ou desenvolvido. Segundo Leite (1998), é importante lembrar que não existe modelo para sistemas de validação, portanto, o interessado deve fazer adaptações adequadas às suas necessidades.

Conforme a NBR ISO 9000, citado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2003), *validação* é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos.

As estratégias gerais para validação de um método dependem das características de desempenho do método (ou parâmetros de validação) que devem estar claramente declarados no procedimento. Estes parâmetros dependem, entre outros fatores, das amostras, dos propósitos analíticos e da instrumentação disponível. Elas podem envolver: o estabelecimento da linearidade, da exatidão (recuperação) e precisão (repetitividade), dos limites de detecção, da comparação com métodos convencionais; da avaliação com amostras-padrão e de comparações interlaboratoriais (LEITE, 1998 ; INMETRO, 2003).

Para análise de traços, em matrizes complexas como as amostras de alface, a aplicação de micro-extração em fase sólida, com cromatografia gasosa de alta resolução utilizando um detector de captura de elétrons (MEFS/CGAR/DCE) deve ser complementada através de cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (EM) como detector, devido à sua característica de alta sensibilidade e seletividade.

A escolha do método quantitativo pela técnica MEFS depende em primeiro lugar da natureza da matriz. Matrizes simples, como a água potável, por exemplo, não possuem componentes que interferem no processo de extração, portanto, a curva básica

de calibração externa pode ser usada na quantificação por MEFS (PAWLISZYN, 1997).

Um outro método, o da calibração interna, apesar de mais trabalhoso, é menos sensível a erros. Consiste na preparação de uma curva de calibração com soluções padrão contendo duas substâncias padrão. Um dos padrões tem que ser igual à substância que se deseja analisar (denominado padrão externo) e a outra não, mas tem que ter natureza e comportamento semelhantes (denominado padrão interno). O padrão externo é adicionado em concentrações crescentes, enquanto o padrão interno não, permanece fixo. A curva é feita colocando-se na abscissa as concentrações do padrão externo e na ordenada as razões (R_p) entre as medidas da área do padrão externo (A_{pe}) e da área do padrão interno (A_{pi}), sendo $R_p = A_{pe}/A_{pi}$. A A_{pe} , obrigatoriamente, será diferente em cada concentração, mas a A_{pi} será sempre a mesma, pois a quantidade adicionada de padrão interno é constante. O padrão interno terá que ser adicionado também à amostra na mesma concentração da solução padrão. A razão R_x (razão entre

a área do componente a analisar na amostra/Api) é determinada e seu valor é extrapolado no gráfico, determinando-se, nessa hora, a concentração Cx do componente pesquisado (COLLINS et al., 1996).

Em matrizes mais complexas ocorre que alguns de seus componentes, material em suspensão, por exemplo, podem no processo de extração competir com o revestimento da fibra ou pode modificar as propriedades do revestimento, como é o caso de analitos com características surfactantes. Segundo COLLINS e colaboradores (1996) o método de extrapolação linear por adição padrão, é especialmente importante quando a amostra é muito complexa, quando as interações com a matriz são significativas e quando houver dificuldade de se encontrar um padrão interno adequado. Consiste na adição padrão crescente de quantidade conhecida da substância que está sendo analisada a uma quantidade conhecida da amostra e construção de um gráfico, cuja extrapolação no eixo da abscissa fornecerá a concentração do analito na amostra.

A *linearidade* é a capacidade de um método analítico produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito nas amostras em estudo, em uma dada faixa de concentração. A linearidade é obtida por padronização (curva de calibração interna ou externa) e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (INMETRO, 2003)

A equação da reta, que expressa o sinal analítico (resposta) em função da concentração é:

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

onde:

y = sinal analítico medido.

x = concentração.

a = coeficiente angular (sensibilidade).

b = coeficiente linear.

O coeficiente de correlação (r) é usado para indicar se esta equação é adequada como modelo matemático para as medidas em questão. Dependendo da ordem de grandeza da concentração do analito, alguns autores aceitam um valor de r maior que 0,90 (INMETRO, 2003) outros consideram $r = 0,995$ (SOUZA CRUZ, 2003) como representativo de uma relação linear proporcional entre a resposta do equipamento e a concentração do analito como satisfatória.

Com o objetivo de validar o método, os procedimentos e a análise de seus resultados devem ser realizados considerando alguns princípios básicos da estatística a fim de medir a sua precisão e a exatidão. Precisão (repetitividade) e exatidão (recuperação) são atributos obrigatórios nos resultados para que determinado método quantitativo seja considerado viável. Na análise quantitativa de resíduos, entretanto, as incertezas são, vias de regra, relativamente altas, e em alguns casos podem possuir a mesma grandeza da quantidade a ser medida. Para um dado procedimento alguns fatores podem contribuir para perdas de analitos, levando, assim, a resultados mais baixos do que o esperado, e para outros podem produzir contaminações que, ao

contrário das perdas, geram resultados superestimados. A ocorrência destes fatores produzirá, no final de várias réplicas, resultados com um grande coeficiente de variação. Em uma análise quantitativa todas as etapas devem ser desenvolvidas com muito cuidado para que erros sejam evitados. A amostra a ser analisada deve ser representativa do total e não deve haver perdas e nem contaminações durante sua preparação (NOBRE, 1990).

A etapa de separação dos componentes da amostra por cromatografia também pode ser fonte de erros como: adsorção irreversível de parte da amostra na fase estacionária ou suporte; resposta do detector afetada por alterações de temperatura e vazão; quantidade de amostra injetada fora da faixa de linearidade do detector; etc (COLLINS et al., 1996). Neste contexto, é interessante observar a distinção de dois tipos de erros: os randômicos e os sistemáticos. Os primeiros resultam em interferência na precisão, devido a incertezas nas medidas em cada fase, como pesagem, tomadas de alíquotas, falhas na homogeneização da amostra e ruído instrumental entre outros. Os erros sistemáticos afetam a exatidão, pois produzem resultados com valores que se afastam do valor real. Este se deve a utilização de método impróprio para o objetivo que se deseja alcançar, muitas vezes pela substituição ou retirada de uma ou mais fases de um procedimento (NOBRE, 1990).

A *exatidão* de uma medida é o grau com que o resultado coincide com o valor verdadeiro e a *precisão* é o grau com que um conjunto de resultados é agrupado em torno de um valor médio obtido experimentalmente. Boa precisão significa boa reprodutibilidade de resultados, mas não, necessariamente, boa exatidão (NOBRE, 1990).

A forma mais comum de se determinar a precisão de uma medida é através do coeficiente de variação relativo (% CV), conhecido também como desvio padrão relativo (GOMES, 2000):

$$\% (CV) = \frac{s}{x} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde:

$\% (CV)$ = *coeficiente de variação.*

s = *desvio padrão das medidas.*

x = *média das medidas.*

Para o cálculo do desvio padrão (s), tem-se

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad (3)$$

Onde:

x_i = *valor da medida*

\bar{x} = *média das medidas*

N = *número de medidas*

A exatidão de uma medida pode ser determinada com amostras de referência, por comparação com outro método, ou também através da recuperação relativa (R%) do analito. No primeiro, as amostras de referência possuem certificados contendo as medidas com os valores pré-determinados aceitos como reais. Tais valores servem como pontos de referência para comparações com os obtidos no experimento em questão. As únicas desvantagens deste método são a dificuldade em se encontrar amostras certificadas com características próximas às amostras a serem analisadas e o seu alto custo (geralmente importados) (NOBRE, 1990).

Toda amostra que recebe tratamento de análise indireto (diluição, extração, concentração, derivação, etc.) deve ter calculado, experimentalmente, o erro ou a perda do analito em questão. Assim, o uso de um fator de recuperação (%R) torna o resultado mais próximo da realidade (LEITE, 1998). Para isto, procede-se à análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do analito (*spike*) em, pelo menos, três concentrações diferentes. A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado pode não ficar, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra (INMETRO, 2003).

$$\% R = \frac{\text{Quantidade encontrada}}{\text{Quantidade adicionada}} \cdot 100 \quad (4)$$

Em análise de traços, aceita-se, normalmente o nível de 70 a 120% de recuperação para o analito de interesse (BRASIL, 2004).

A exatidão também pode ser determinada, através da aplicação de um método já estabelecido (A) em paralelo ao método proposto (B). Após determinação dos desvios padrão dos métodos, um teste de variância deve ser realizado para comparação dos resultados. Este tipo de teste considera a razão entre dos quadrados das variâncias das amostras entre os dois métodos (A e B) (MILLER & MILLER, 1993). Esta razão é denominada de F (que deve ser comparado com F tabelado) e é dada por:

$$F = s^2_A / s^2_B$$

(Um outro modo de comparar dois métodos analíticos o que será testado e um de referência) é pela aplicação da análise de variância, calculando-se o valor t (além dos desvios padrão das medidas) em um determinado intervalo de confiança e compará-lo ao tabelado (MILLER & MILLER, 1993).

Atualmente, programas simples de computadores calculam os resultados pelos dois métodos acima descritos.

Considerando-se a necessidade de detectar analitos ao nível de traços, definir limite de detecção torna-se muito importante, uma vez que é comum a confusão gerada por uma série de conceitos apresentados pela literatura. Em termos gerais, pode-se descrever o limite de detecção de um analito como a concentração que proporciona um

signal no instrumento, significativamente diferente do signal de uma amostra em branco ou signal de fundo (MILLER & MILLER, 1993).

Na prática, *o limite de detecção* é a menor concentração do analito que pode ser medida, com confiança aceitável, considerando uma solução-branco. Ele é estimado com base na resposta ou signal medido, mas é apresentado, normalmente, em termos de concentração ou quantidade (massa) (NOBRE, 1990).

A International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC, 1987) expressa o limite de detecção (LD) como:

$$LD = \frac{3s}{S}$$

Onde:

s = Desvio padrão das medidas do branco

S = Sensibilidade do método = $\frac{\text{signal (área)}}{\text{concentração}}$

Para análise quantitativa de agrotóxicos organoclorados (AOC), após a fase de estabelecimento das condições ideais de tratamento da amostra e otimização dos parâmetros MEFS-ID/CGAR/DCE (**Capítulo III**), tem-se a fase seguinte, que é o objetivo deste capítulo.

1.2 OBJETIVO

Validar o método MEFS-ID/CGAR/DCE para análise de agrotóxicos organoclorados em amostras da água e de alface, enfocando os seguintes itens:

Determinar e estabelecer cada parâmetro quantitativo, para o método proposto, através de experimentos e uso da estatística, como precisão, linearidade, limites de detecção e exatidão em amostras fortificadas (*spiked*).

Avaliar a adequação do método proposto, através do conjunto de resultados dos parâmetros quantitativos: precisão, linearidade, limites de detecção, e exatidão em amostras fortificadas (*spiked*).

Estudar a aplicação do método proposto em amostras de água e alface coletadas exclusivamente para análise.

Realizar comparações, na quantificação de agrotóxico organoclorados, entre os resultados obtidos pelo método proposto e por outro que utilize a técnica convencional líquido-líquido (ELL) que tenha sido adotado como oficial.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1. EQUIPAMENTOS

Todos os equipamentos encontram-se listados no **item 2.1.1.** do **Capítulo III.**

2.1.2 ACESSÓRIOS ESPECÍFICOS PARA MEFS

Os acessórios da MEFS são os mesmos descritos no **item 2.1.2** do **Capítulo III.**

2.1.3. VIDRARIAS E OUTROS ACESSÓRIOS DE LABORATÓRIO

Todas as vidrarias e acessórios encontram-se no **item 2.1.3** do **Capítulo III.**

2.1.4 REAGENTES, SOLVENTES E GASES

Além dos descritos no **item 2.1.4.** do **Capítulo III** incluem-se os reagentes abaixo para serem usados na extração convencional ELL, como será descrito mais adiante:

- Diclorometano grau pesticida – Merck.
- Acetona grau pesticida – Merck.
- Hexano grau pesticida – Merck.
- Sulfato de sódio anidro P.A. – Vetec.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 TRATAMENTO DOS MATERIAIS NÃO DESCARTÁVEIS

O tratamento de todos os materiais não descartáveis, como vidrarias e outros acessórios, foi realizado conforme os procedimentos do **item 2.2.1** (**Capítulo III**) da otimização.

2.2.2 PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES PADRÃO DE AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS (LINDANO; ALDRIN; DIELDRIN; TDE; MIREX; DDE)

Foram preparadas soluções metanólicas individuais e mistas de trabalho dos agrotóxicos organoclorados estudados (Lindano, Aldrin, DDE, Dieldrin, TDE e Mirex). Para isto os agrotóxicos organoclorados (sólidos cristalinos) foram dissolvidos

em metanol conforme procedimentos do **item 2.2.2 (Capítulo III)** da otimização. Todos os organoclorados apresentaram boa solubilidade neste solvente com exceção do Mirex, cuja dissolução foi auxiliada pelo ultra-som.

Essas soluções foram preparadas para serem usadas em fortificações para o estudo dos parâmetros analíticos e/ou para a aplicação do método de adição padrão para a quantificação de DDE nas alfaces.

2.2.3 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA VALIDAÇÃO DA MEFS

2.2.3.1. Amostras de água

As amostras de água foram subdivididas em dois grupos quanto á finalidade no experimento: amostras de água fortificadas e amostras de água coletadas para análise de agrotóxicos.

a) Amostras de água fortificadas

As amostras de água fortificadas, simulando águas contaminadas, foram utilizadas, exclusivamente, para o estudo do método proposto MEFS-ID/CGAR/DCE já otimizado, quanto á precisão, limite de detecção, linearidade e recuperação dos cinco agrotóxicos organoclorados estudados em água: Lindano, Aldrin, Dieldrin, TDE e Mirex.

As amostras de água fortificadas foram preparadas através de adições de solução-padrão mista de trabalho na água ultrapura (obtida a partir da passagem de água destilada no sistema de purificação Milli-Q) no próprio frasco extrator, como descrito a seguir: a extração por MEFS foi realizada após transferência de 15,00 mL de água ultrapura para o frasco de extração e adição de alíquotas de solução padrão mista de trabalho, a 100 ppb (ng/mL), finalizando fortificações na faixa de 0,5 a 3,5 ppb (ng/mL).

b) Amostras de água coletadas para análise

Para aplicação do método proposto na determinação dos agrotóxicos organoclorados em água, foram coletadas de 4 residências, localizadas na Cidade do Rio de Janeiro (RJ), amostras de água de suas torneiras.

2.2.3.2. Amostras de alface

As amostras de alface também foram subdivididas em dois grupos, conforme o objetivo do experimento:

a) Amostras de alface fortificadas

As amostras de alface fortificadas, simulando alfaces contaminadas, foram utilizadas, para o estudo do método proposto MEFS-ID/CGAR/DCE já otimizado, quanto á precisão, limite de detecção, linearidade e recuperação dos cinco agrotóxicos organoclorados estudados em água: Lindano, Aldrin, DDE, Dieldrin, TDE e Mirex.

Estas alfaces foram adquiridas a partir de cultivo isento de agrotóxicos em terreno particular, localizado em Ponta Negra, Maricá (RJ) (mesma amostra usada na otimização, Capítulo III).

Depois de coletada, foram embaladas e conservadas sob refrigeração até o momento do uso sob a forma de extrato aquoso de alface.

Com estas alfaces foram preparados extratos aquosos de alface, fragmentando-se a alface em água através de homogeneizador, filtração e diluição 1:50 (já descrito no item **2.2.3.b do Capítulo III**).

A extração por MEFS foi realizada após transferência de 15,00 mL deste extrato aquoso de alface para o frasco de extração, realizaram-se as fortificações com alíquotas de solução padrão mista de trabalho a 100 ppb (ng/mL) finalizando fortificações na faixa de 0,6 a 34,8 ppb (ng/mL).

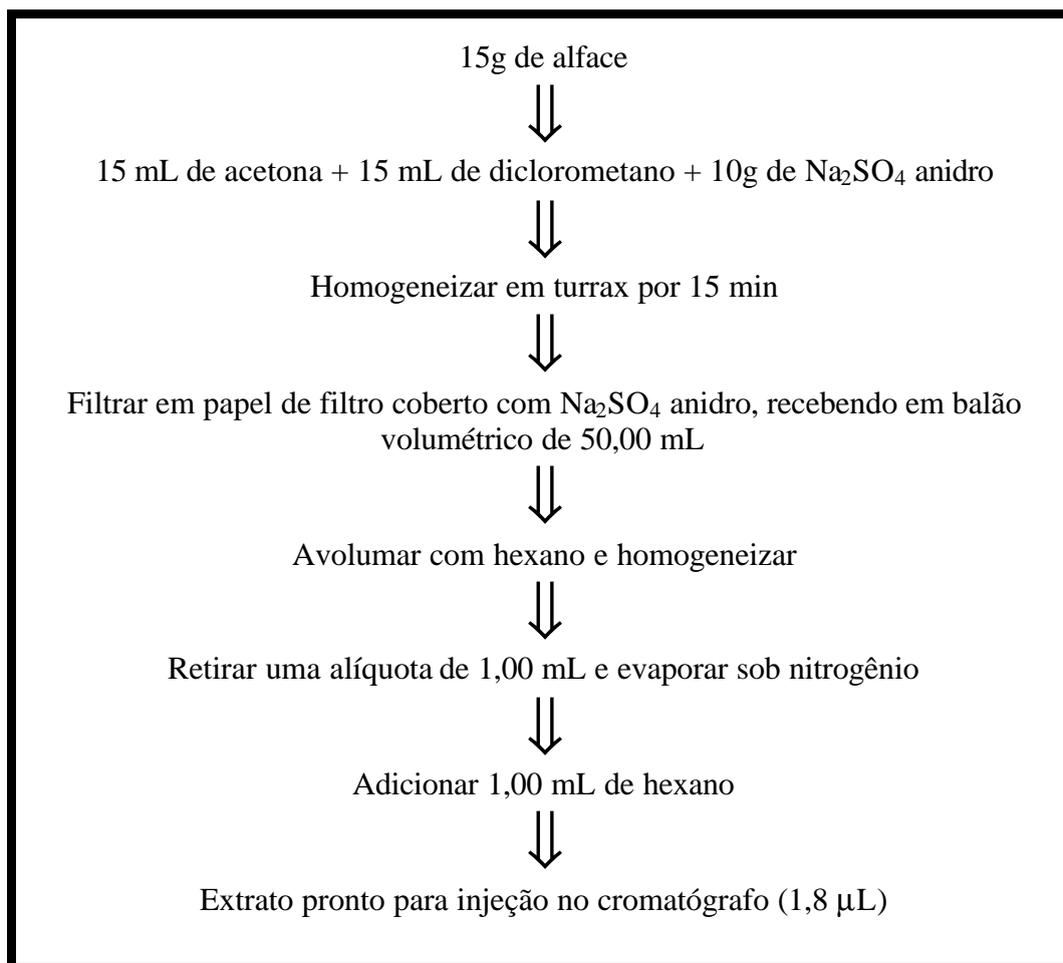
b) Amostras de alface coletadas para análise

Para aplicação do método proposto na determinação dos agrotóxicos organoclorados estudados, quatro amostras de alface (O1, O2, C1 e C2) foram adquiridas em quatro diferentes plantações localizadas em São José do Vale do Rio Preto (RJ).

As amostras O1 e O2 foram obtidas de cultivo orgânico e as amostras C1 e C2 de cultivo convencional, como será verificado mais adiante, em todas estas amostras o DDE foi encontrado.

2.2.4 CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ELL)

Para efeitos comparativos, entre o método proposto e um oficial, realizaram-se extrações utilizando a técnica de extração líquido-líquido, ELL, para análise de DDE nas amostras de alface (O1, O2, C1 e C2) após a detecção e identificação nestas amostras como será relatado a seguir. A extração ELL foi realizada de acordo o procedimento modificado do Ministério da Saúde da Holanda (HOLANDA, 1996) usando hexano ao invés de éter de petróleo. O fluxograma a seguir descreve, sucintamente, esta metodologia.



2.2.5 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Cromatógrafo Gasoso de Alta Resolução com Detector de Captura de Elétrons (CGAR/DCE)

As análises cromatográficas para validação foram realizadas em CGAR/DCE com programação conforme o procedimento do **item 2.2.4** da otimização (**Capítulo III**).

2.2.6 CONDICIONAMENTO DA FIBRA PDMS-100

O condicionamento da fibra PDMS-100 foi realizado no injetor do CGAR com temperatura de 250 °C, por 1 hora.

2.2.7 TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS DOS DADOS

A média obtida para cada amostra, pelos dois métodos, foram comparadas ao nível de 95% de confiança, pelas análises de variâncias e pelo teste t de Student, através do programa contido no MicroCal Origin.

Os desvios-padrão, as curvas analíticas e as regressões lineares foram realizados também pelo programa MicroCal Origin. Os gráficos de barra foram construídos com auxílio do Microsoft Excel.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ESTUDO DA PRECISÃO, LINEARIDADE, LIMITES DE DETECÇÃO E EXATIDÃO DO MÉTODO MEFS-ID/CGAR/DCE

Todos os parâmetros do método MEFS-ID/CGAR/DCE que foram otimizados e estabelecidos no **Capítulo III** serão neste capítulo aplicados para o estudo das propriedades quantitativas, em amostras de água e alface.

Na **Tabela 14** estão descritos os principais parâmetros:

Tabela 14 Principais parâmetros de extração, dessorção e cromatográficas de análise para determinação de agrotóxicos organoclorados em amostras de água e alface, para validação do método MEFS-ID/CGAR/DCE, otimizados no Capítulo III

CONDIÇÕES MEFS	CONDIÇÕES DO CGAR/DCE
Volume de amostra: 15,00 mL	$t_D = 120s$
Fibra: PDMS 100 μm	Injetor <i>split-splitless</i> , 250°C, com fluxo de gás carreador hélio (<i>splitflow</i>) de 50 mL/min; modo <i>splitless</i> em tempo = 120s
Modo: Imersão direta (ID)	
Velocidade de Agitação = 1.200 rpm	Coluna capilar, fase DB-5 (29m x 0,25mm diâmetro interno, com espessura do filme de 0,25 μm); gás carreador (hélio) com velocidade de fluxo constante de 0,5 mL/min
$t_E = 20 \text{ min}$	
$T_{(ambiente)} = 25 \pm 2 ^\circ C$	Gás <i>make-up</i> (nitrogênio), velocidade de fluxo de 30 mL /min
Mudança da força iônica: não	Programação da variação da temperatura do forno (item 2.2.4 do Capítulo III)
Ajuste do pH: não	Detector de captura de elétrons (^{63}Ni), 250°C (base) e 300 $^\circ C$ (corpo).

t_E = tempo de extração; t_D = tempo de dessorção; T = temperatura

As médias dos tempos de retenção também obtidos no **Capítulo III**, foram utilizadas para auxiliar a identificação dos analitos.

Seus valores e respectivos coeficientes de variação encontram-se na **Tabela 15**.

Tabela 15 Média (N = 3) dos tempos de retenção (tr) obtidos para cada agrotóxicos e respectivos coeficientes de variação (%CV) para as soluções-amostra de água e extratos aquosos de alface fortificados, por MEFS-ID/CGAR/DCE

AGROTÓXICO	ÁGUA FORTIFICADA ^(a)		ALFACE FORTIFICADA ^(b)	
	tr médio (min)	% CV	tr médio (min)	% CV
Lindano	13,09	1,0	13,00	1,5
Aldrin	16,05	1,5	16,21	2,1
DDE	N.A.	N.A.	20,60	1,5
Dieldrin	20,87	0,5	20,82	0,7
TDE	21,98	0,7	21,70	1,0
Mirex	25,00	0,6	24,90	0,9

(a) Solução-amostra de água ultra-pura fortificada 0,5 ng/mL

(b) Solução-amostra de extrato aquoso de alface fortificada 0,6 ng/mL

N.A. não analisado

3.1.1 PRECISÃO DAS MEDIDAS – REPETITIVIDADE

A *precisão*, também denominada de repetitividade, das medidas do método MEFS-ID/CGAR/DCE para cada agrotóxico, foi determinada de acordo com as condições otimizadas na **Tabela 14**.

Este parâmetro analítico, expresso sob a forma de coeficiente de variação (% CV), foi calculado através das médias (N=7) das áreas obtidas para cada pico e de seus respectivos desvios padrão.

A precisão foi determinada para a matriz água e para a matriz alface, como a seguir:

a)% CV na amostra de água fortificada: no frasco extrator foram adicionados 15,00 mL de água ultrapura e 80 µL de solução-padrão mista de trabalho a 100 ppb (ng/mL), o que representa uma massa adicionada de cada agrotóxico de 8 ng, produzindo para cada agrotóxico uma concentração final de 0,5 ppb (ng/mL). Nesta mesma solução a micro-extração foi realizada 07 vezes.

b) **CV% na amostra de alface fortificada:** no frasco extrator foram adicionados: 15,00 mL de extrato aquoso de alface e a alíquota de 90 μ L de solução-padrão mista de trabalho a 100 ppb (ng/mL), o que representa uma massa adicionada de cada agrotóxico de 9 ng, produzindo uma concentração final para cada agrotóxico de 0,6 ppb (ng/mL). Nesta mesma solução a micro-extração foi realizada 07 vezes.

Nesta etapa foi verificado que, para a obtenção de resultados satisfatórios de CV%, foi importante fazer a limpeza da fibra para que não houvesse o efeito memória que tem efeito adverso sobre a precisão.

Os resultados encontram-se na **Tabela 16**.

Tabela 16 Coeficientes de variação (%CV) do método de análise por MEFS-ID/CGAR/DCE obtido para cada agrotóxico nas soluções-amostra fortificadas de água ultrapura e extrato de alface (N = 7)

AGROTÓXICO	% CV	
	ÁGUA FORTIFICADA ^(a)	ALFACE FORTIFICADA ^(b)
Lindano	1,89	11,0
Aldrin	2,45	10,2
DDE	N.A.	9,28
Dieldrin	2,32	10,1
TDE	1,11	7,75
Mirex	10,02	18,5

(a) Solução-amostra de água ultra-pura fortificada 0,5 ng/mL

(b) Solução-amostra de extrato aquoso de alface fortificada 0,6 ng/mL

N.A. = não analisado

Os coeficientes de variação das medidas na água fortificada (**Tabela 16**) não foram maiores que 10,2 %.

Considerando que as medidas foram realizadas na amostra fortificada em baixa concentração, isto é, décimos de ppb (0,5 ng/mL), estes resultados podem ser considerados excelentes para proporcionar determinações ao nível de traços.

Estes resultados obtidos vão de encontro aos que Madgic e Pawliszyn (1996) encontraram no estudo de precisão do método MEFS-ID/CGAR/DCE para análise de AOC (Lindano, Dieldrin, DDE e TDE), em amostras de água. Eles observaram com estes experimentos coeficientes de variação na faixa de 3 a 20% e ressaltaram que uma precisão maior poderia ser conseguida se a análise fosse realizada com amostrador automático ao invés do manual.

Isto também foi observado no presente trabalho. A retirada da seringa da solução, e, em seguida, a caminhada até o cromatógrafo para que a mesma seja inserida no injetor para dessorção ser realizada, tornou a técnica sujeita a muitas variações.

Aguilar e colaboradores (1999), usando a mesma técnica, também para amostras de água, encontraram uma precisão entre 8 e 22% para fortificações de 0,15 ng/mL, para os mesmos agrotóxicos estudados (com exceção do Mirex que não foi estudado por eles). Frente a estes resultados os autores mencionam que a MEFS/CG é um método promissor para análise de traços.

No caso do experimento com alface (**Tabela 16**), o valor mais alto do coeficiente de variação (18,5 %) ocorreu com o Mirex, o que se deve, principalmente, ao efeito produzido pela matriz.

Além disso, este agrotóxico não vem apresentando, desde o início dos experimentos, uma extração que siga o perfil dos outros compostos estudados. Mesmo assim, o valor mais alto obtido, para os coeficientes de variação, não ultrapassou os 30 % que é o máximo estabelecido para análise de traços ser considerada dentro dos parâmetros de confiabilidade (ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 1989).

3.1.2 LINEARIDADE

Como ocorreu na determinação dos parâmetros anterior, a linearidade do método MEFS-ID/CGAR/ECD, para cada agrotóxico, foi determinada de acordo com as condições otimizadas na **Tabela 14** e através dos seguintes experimentos:

a) **Linearidade na amostra de água fortificada:** a água ultra-pura foi fortificada em concentração final de 0; 0,5; 1,0; 2,5 e 3,5 ng/mL, para cada agrotóxico. A extração por MEFS ocorreu em triplicata (N = 3) em cada ponto (com exceção da amostra 0,5 ng/mL que para o estudo da precisão, como foi relatado anteriormente, e do limite de detecção, mais adiante, foi extraída 7 vezes).

A extrações ocorreram sempre na mesma solução, na seguinte seqüência: no frasco extrator foram adicionados 15,00 mL de água ultrapura. A extração por MEFS no primeiro ponto da curva foi realizada sem adição de agrotóxico e gerou área zero para todos os agrotóxicos. Para ocorrer nova extração por MEFS, correspondendo ao segundo ponto, foi adicionada (nos mesmos 15,00 mL de água ultrapura da extração anterior) uma alíquota de solução padrão mista de trabalho, com uma massa correspondente de 8 ng de cada agrotóxico, o que produziu uma concentração de 0,5 ng/mL (aqui N=7). Para as outras adições, sempre nos mesmos 15,00 mL, produzindo concentrações de 1,0; 2,5 e 3,5 ng/mL, as massas finais adicionadas foram de 16; 39 e 54 ng, respectivamente (**Quadro 1**). Em cada ponto as extrações por MEFS foram realizadas (N=3) e a média as áreas correspondentes foram utilizadas para a construção da curva. Então, do início ao fim a solução foi a mesma, e isto é uma vantagem, pois oferece menos fonte de erros e o preparo de várias soluções utilizando várias vidrarias.

Para aumentar a precisão das medidas, as adições foram realizadas no mesmo dia conforme o **Quadro 1** a seguir:

Quadro 1: Concentração e volume da solução padrão mista de trabalho utilizada para o preparo da solução-amostra de água fortificada na faixa de 0,5 a 3,5 (ng/mL), para estudo da validação da MEFS.

Solução padrão mista de trabalho contendo os cinco agrotóxicos organoclorados ⁽¹⁾			Solução-amostra de água fortificada para a realização da MEFS ⁽²⁾		
C (ng/mL) ⁽³⁾	V (ml) acrescentado	Massa (ng) acrescentada	Massa (ng) Final	Volume (ml) final ⁽⁴⁾	C (ng/ml) ⁽³⁾ final
100	0,08	8	8	15,08	0,5
100	0,08	8	16	15,16	1,0
100	0,23	23	39	15,39	2,5
100	0,15	15	54	15,54	3,5

(1) Solução padrão mista de trabalho preparada no **item 2.2.b do Capítulo III**

(2) Solução preparada no próprio frasco extrator da MEFS

(3) Concentração de cada agrotóxico em ppb

(4) Volume da água ultrapura + alíquota da solução padrão mista de trabalho.

Como já mencionado, as fortificações foram realizadas no próprio frasco onde a MEFS foi realizada e observou-se que para dar continuidade, a solução fortificada não podia ser armazenada até o dia seguinte, pois os resultados já não repetiam os do dia anterior.

Os resultados deste experimento são apresentados, a seguir, na **Tabela 17**.

b) Linearidade na amostra de alface fortificada: no caso da alface, o que se usou como matriz foi o extrato aquoso de alface (extrato aquoso de alface = alface + água + homogeneização, seguida de filtração com diluição 1:50, como já foi descrito anteriormente). Um volume de 15,00 mL também foi usado para a fortificação, mas em concentrações finais diferentes: 0,6; 1,2; 3,0; 9,4; 13,4; 23,5 e 36,8 ng/mL para cada agrotóxico. A extração por MEFS ocorreu também em triplicata (N=3) em cada ponto (com exceção da amostra 0,6 ng/mL que para o estudo da precisão, como foi relatado anteriormente, e do limite de detecção, mais adiante, foi extraída 7 vezes).

As tomadas de alíquotas para a fortificação do extrato aquoso de alface se apresentam no **Quadro 2** a seguir.

Quadro 2 Concentração e volume da solução padrão mista de trabalho utilizada para o preparo do extrato aquoso de alface fortificado na faixa de 0,6 a 36,8 (ng/mL), para estudo da validação da MEFS

Solução padrão mista de trabalho contendo os cinco agrotóxicos organoclorados ⁽¹⁾			Solução-amostra de extrato aquoso de alface fortificada para a realização da MEFS ⁽²⁾		
C (ng/mL) ⁽³⁾	V (ml) acrescentado	Massa (ng) acrescentada	Massa (ng) final	Volume (mL) Final ⁽⁴⁾	C (ng/mL) ⁽³⁾ final
100	0,09	9	9	15,09	0,6
100	0,09	9	18	15,18	1,2
100	0,28	28	46	15,46	3,0
1000	0,09	90	136	15,55	9,0
1000	0,07	70	206	15,62	13,2
1000	0,16	160	366	15,78	23,2
1000	0,19	190	556	15,97	34,8

(1) Solução padrão mista de trabalho preparada no **item 2.2.b do Capítulo III**

(2) Extrato aquoso fortificado no próprio frasco extrator da MEFS

(3) Concentração de cada agrotóxico em ppb

(4) Volume final = volume do extrato aquoso + alíquota da solução padrão mista de trabalho.

Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 17** a seguir.

Na **Tabela 17** as equações resultantes dos experimentos anteriores são apresentadas.

Elas expressam a linearidade das medidas e seus respectivos coeficientes de correlação, para cada agrotóxico em solução-amostra de água ultrapura fortificada e em extrato de alface fortificada.

Na **Tabela 17** pode-se observar que na faixa de concentração estudada, ocorreu um comportamento linear com valores de **r** maiores do que 0,995, com exceção do Mirex ($r = 0,980$). Este fato demonstra uma boa eficiência da aplicação do método para a quantificação de todos os agrotóxicos estudados, sempre evidenciando que estes resultados estão vinculados a concentrações de ppb, o que é muito favorável para análise de traços.

Segundo o Protocolo Mínimo para Validação de Métodos Analíticos publicado pela Souza Cruz (2003), nesta etapa de validação uma relação linear e proporcional entre o sinal analítico e a concentração do analito é considerada satisfatória quando **r** = 0,995.

Tabela 17 Equações de linearidade ($y = ax + b$) e respectivos coeficientes de correlação (r) obtidos pela análise por MEFS-ID/CGAR/DCE de cada agrotóxico em solução-amostra de água ultrapura fortificada e em extrato aquoso de alface fortificada ($N = 3$)

AGROTÓXICO	CURVA ANALÍTICA	
	ÁGUA FORTIFICADA ⁽¹⁾	ALFACE FORTIFICADA ⁽²⁾
Lindano	$y = 2,35 \text{ E}06 x + 1,08 \text{ E}05$ ($r = 0,9993$)	$y = 7,73 \text{ E}06 x + 3,15 \text{ E}06$ ($r = 0,9979$)
Aldrin	$y = 3,12 \text{ E}06 x + 6,65 \text{ E}05$ ($r = 0,9950$)	$y = 6,74 \text{ E}06 x + 2,13 \text{ E}06$ ($r = 0,9982$)
DDE	N.A.	$y = 5,14 \text{ E}06 x - 2,73 \text{ E}06$ ($r = 0,9961$)
Dieldrin	$y = 4,29 \text{ E}06 x + 4,07 \text{ E}05$ ($r = 0,9979$)	$y = 7,46 \text{ E}06 x + 3,29 \text{ E}06$ ($r = 0,9993$)
TDE	$y = 5,28 \text{ E}06 x + 7,95 \text{ E}05$ ($r = 0,9966$)	$y = 6,79 \text{ E}06 x + 2,46 \text{ E}06$ ($r = 0,9956$)
Mirex	$y = 2,68 \text{ E}05 x + 6,53 \text{ E}04$ ($r = 0,9851$)	$y = 1,05 \text{ E}05 x + 9,92 \text{ E}03$ ($r = 0,9830$)

(1) Solução-amostra de água ultra-pura fortificada 0,5 a 3,5 ng/mL

(2) Solução-amostra de extrato aquoso de alface fortificada 0,6 a 36,8 ng/mL

y = área; a = coeficiente angular; x = concentração em ng/mL; b = coeficiente linear

N.A. = não analisado

Os resultados obtidos neste experimento indicaram linearidade somente a partir de 0,5 ng/mL, enquanto que Magdic e Pawliszyn (1996) trabalhando com MEFS-ID/CGAR, com detector de EM, em amostras de água, obtiveram linearidade para os AOC (Lindano, Dieldrin, DDE e TDE) a partir de 0,01 ng/mL. Os autores, entretanto, verificaram que em concentrações maiores que 1 ng/mL não foi possível a obtenção de respostas lineares. No presente trabalho a linearidade foi estudada até 3,5 ng/mL para água e até 36,8 ng/mL para o extrato aquoso de alface. Concentrações mais elevadas causaram desvios. No caso da amostra de água fortificada os desvios provavelmente foram ocasionados pela concentração atingida, relativamente alta, de metanol dentro do frasco extrator. Isto porque para a fortificação da água utilizou-se sempre a mesma solução padrão (100 ng/mL) o que resultou na utilização de grandes volumes de solução padrão quando a concentração foi de 9 a 35 ng/mL o que causou desvios nesta faixa. No caso da amostra de alface isto não foi observado, pois para esta faixa a solução padrão foi mais concentrada contribuindo com menos volume de metanol.

O metanol, dependendo de sua concentração, modifica significativamente a polaridade da água.

De acordo com Pawliszyn (1997), em MEFS, a quantidade de analito extraída pela fibra é diretamente proporcional à sua concentração na solução-amostra, permitindo a construção de uma curva de calibração. Ele destaca que desvios da linearidade, na maioria dos casos, não estão relacionados com a etapa de extração propriamente dita e sim com efeitos da matriz e diferenças entre detectores.

Magdic e Pawliszyn (1996) também observaram que a linearidade vai depender muito do detector usado. Com o detector de ionização de chamas (DIC) eles verificaram que a faixa de linearidade só era obtida em concentração mínima 10 vezes

maior do que a mínima (0,01 ng/mL) para o DCE , indicando que este detector é mais sensível que o DIC para estes compostos.

Os resultados obtidos por Aguilar e colaboradores (1999), entretanto, vão mais ao encontro aos obtidos no presente trabalho, pois eles encontraram uma faixa de linearidade de 0,1 a 10 ng/mL para o mesmo método usando DCE, com uma correlação de 0,995 a 0,999.

Estes resultados são muito importantes para análise de agrotóxicos pois possibilitam a quantificação, ao nível de traços, pelo método proposto nos 2 tipos de matrizes. Vale lembrar que amostras com concentrações maiores que o limite máximo da faixa linear determinada não são impossibilitadas de serem analisadas pelo método. Muito pelo contrário, com a necessidade de diluições, a probabilidade de aumentar as recuperações é maior, desde que não resultem em concentrações abaixo do limite de detecção. Como já mencionado no Capítulo III, Simplício & Vilas Boas (1999) verificaram que diluições aumentavam a quantidade de pesticidas livres de interferentes naturais das amostras, tornando a recuperação melhor.

Esta curva analítica, além de ter servido para o cálculo do limite de detecção (item 3.1.3) serviu também para a determinação da recuperação média (da faixa de concentração acima estudada) como será verificado no item 3.1.4.

3.1.3 LIMITES DE DETECÇÃO

O limite de detecção do método MEFS-ID/CGAR/ECD, para cada agrotóxico, foi determinado a partir do coeficiente angular (a) da curva da linearidade (item anterior), considerando o desvio padrão das 7 repetições (N = 7) na concentração mais baixa adicionada que apresentou sinal: 0,5 ng/mL para amostra de água e de 0,6 ng/mL para amostras de alface. Os dados foram para a seguinte expressão:

$$\text{Limite de detecção} = (3 \times S) / a \quad \text{onde:}$$

S = Desvio padrão das sete medidas da mínima concentração detectada

a = Coeficiente angular da curva analítica

Seus valores encontram-se na **Tabela 18**.

Tabela 18 Limites de detecção (L.D.) obtidos da análise por MEFS-ID/CGAR/DCE para cada agrotóxico organoclorado nas amostras de água e alface fortificadas (N = 7)

AGROTÓXICO	L.D. (ng/mL)	
	ÁGUA FORTIFICADA ^(a)	ALFACE FORTIFICADA ^(b)
Lindano	0,029	0,091
Aldrin	0,056	0,173
DDE	N.A.	0,091
Dieldrin	0,043	0,116
TDE	0,100	0,216
Mirex	0,300	0,550

(a) Solução-amostra de água ultra-pura fortificada 0,5 ng/mL

(b) Solução-amostra de extrato aquoso de alface fortificada 0,6 ng/mL

N.A.= não analisado.

Os resultados encontrados para os limites de detecção do método MEFS-ID/CGAR/DCE, aplicado aos agrotóxicos estudados, na faixa de 0,026 a 0,300 ng/mL em água e de 0,091 a 0,550 ng/mL em alface – mais uma vez demonstram que a aplicação do método é vantajosa.

Comparando os resultados obtidos com as duas matrizes, verifica-se que a detecção destes agrotóxicos na água é mais eficiente do que no extrato aquoso de alface, uma vez que atinge valores menores.

Este fato provavelmente se deve ao efeito da matriz (partículas de alface) interferindo na micro-extração. As partículas podem estar diminuindo a superfície de contato entre o analito e a fibra, por aderirem na mesma.

Os valores dos limites de detecção aqui encontrados, são próximos aos estabelecidos em experimentos encontrados na literatura: Magdic e Pawliszyn (1996) na determinação do limite de detecção do método MEFS-ID/CGAR/DCE encontraram valores de 0,10 ng/mL para o TDE e para o DDE ; 0,3 ng/mL para o Dieldrin ; 0,9 ng/mL para o Aldrin e 1 ng/mL para o Lindano. Aguilar e colaboradores (1999) encontraram limites de detecção de 0,20 ng/mL para o DDE e 0,15 ng/mL para o Aldrin, Dieldrin e Lindano.

Os valores obtidos no presente trabalho permitem que análises sejam realizadas, com bastante propriedade, ao nível de traços (décimos de ng/mL) pois os coeficientes de variação não ultrapassam os 18 % (**Tabela 16**). Valores tão baixos de limite de detecção, permitem que sejam realizadas, no preparo da amostra, diluições em larga escala, dependendo da concentração de agrotóxico presente – o que é uma vantagem para aumentar a recuperação.

De acordo com Pawliszyn (1997) a sensibilidade do método pode ainda ser melhorada com o aumento do tempo de extração.

3.1.4 EXATIDÃO – TESTE DE RECUPERAÇÃO

A exatidão do método em cada ponto da curva analítica foi determinada nas amostras de água e extrato aquoso de alface, ambas fortificadas. Através da média das áreas obtidas (N=3) e da equação da reta que representa a curva analítica foi determinada a concentração para cada ponto da faixa de adição. Relacionando cada uma destas concentrações obtidas com a respectiva concentração da fortificação, calculou-se a recuperação para a MEFS em cada ponto. Contabilizando todas as recuperações, foram calculados a recuperação média e seu respectivo CV%, na faixa de fortificação de estudo.

Este cálculo foi realizado para cada agrotóxico e estão na Tabela 19 a seguir.

Tabela 19 Média das recuperações (%R) e coeficientes de variação (%CV) das análises por MEFS-ID/CGAR/DCE dos seis agrotóxicos organoclorados estudados, em amostras de água e alface fortificadas

AGROTÓXICO	ÁGUA FORTIFICADA		ALFACE FORTIFICADA	
	Faixa ^(*) (ng/mL)	%R (%CV)	Faixa ^(*) (ng/mL)	%R (%CV)
Lindano	0,5 a 3,5	101,1 (6,32)	3,00 a 36,8	101,4 (6,15)
Aldrin	0,5 a 3,5	108,0 (10,2)	1,20 a 36,8	103,4 (7,19)
DDE	N.A.	N.A.	3,00 a 36,8	94,70 (13,2)
Dieldrin	0,5 a 3,5	103,1 (3,88)	1,20 a 36,8	99,01 (5,21)
TDE	0,5 a 3,5	100,4 (8,97)	3,00 a 36,8	92,05 (10,8)
Mirex	1,0 a 3,5	98,73 (10,8)	9,40 a 36,8	107,9 (10,6)

(*) = Faixa de concentração da fortificação extraída da curva

N.A. = não analisado

As recuperações obtidas foram de 100,4 a 108,0 % para a água e de 92,05 a 107,9 % para a alface. Os valores de CV foram satisfatórios para as concentrações analisadas e não superiores a 11,0 %.

De acordo com a ANVISA (Resolução, RDC n.44, de 10/05/2000) a recuperação para análise de traços deve permanecer na faixa de 70 a 120 % (BRASIL, 2004). As recuperações obtidas neste experimento estão dentro da faixa considerada satisfatória para análise de traços, estando próximo aos 100 %. Para manutenção de tais valores, Boyd-Boland e colaboradores (1996) sugerem que as quantificações de matrizes complexas sejam realizadas com curvas de adição padrão.

Aguilar e colaboradores encontraram as seguintes recuperações para o método MEFS-ID/CGAR/DCE em amostras de água: 100,8 % (CV = 15 %) para o Lindano;

75,7 % (CV = 26,0 %) para o Aldrin; 103,8 % (CV = 23 %) para o DDE; 104,2 % (CV = 24 %) para o Dieldrin e 113,6 % (CV = 23 %) para o TDE. Estes resultados vão de encontro ao obtido aqui neste experimento.

3.1.5 CONCLUSÕES SOBRE OS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

1. Com a validação, foi possível verificar que este método apresenta desenvolvimento bem sucedido baseado na técnica MEFS para análise de pesticidas organoclorados em amostras de água e alface.
2. O método livre de solvente, mostra boa precisão, linearidade e limites de detecção ao nível de décimos de ng/mL, sendo altamente recomendado para determinação de rotina de pesticidas organoclorados em amostras de alface e de água com baixas concentrações, com as seguintes vantagens:
 - pequeno volume de amostra.
 - simplicidade de extração.
 - baixo custo.
 - capacidade de automação.

3.2 ANÁLISE DE DIFERENTES AMOSTRAS DE ÁGUA E DE ALFACE COLETADAS PARA ANÁLISE – IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO PELO MÉTODO MEFS

O método otimizado para a MEFS-ID foi aplicado com sucesso na pesquisa de AOC em água e em alface como foi indicado pelos resultados da validação (item anterior) e também na quantificação de quatro amostras de alface, de cultivo no sistema convencional e orgânico, como será verificado a seguir.

Este item está relacionado com a aplicação do método proposto otimizado e validado em amostras de água e alface coletadas para análise de agrotóxicos organoclorados.

As principais condições otimizadas de análise estão na **Tabela 14**.

A obtenção e a preparação das amostras estão descritas nos itens **2.2.3.1.2** e **2.2.3.2.2** deste capítulo.

3.2.1 ETAPA INICIAL

Esta etapa consiste de análise qualitativa através de avaliação do perfil cromatográfico após extração por MEFS-ID/CGAR/DCE

a. Amostras de água coletadas

Cada uma das quatro amostras de água coletada em residências foi submetida a MEFS. A etapa de extração foi realizada três vezes em cada amostra para a verificação da presença de agrotóxicos.

Em nenhum dos 12 cromatogramas (N=3, para cada amostra) houve detecção de picos relacionados com o agrotóxico estudado.

Para aumentar a sensibilidade da análise deixou-se mais 10 minutos do tempo otimizado (agora 30 min) para assegurar o resultado qualitativo, repetindo-se a mesma conclusão acima: não houve detecção de nenhum agrotóxico.

A **Figura 27** ilustra, como exemplo, um cromatograma de uma das amostras de água coletadas após análise.

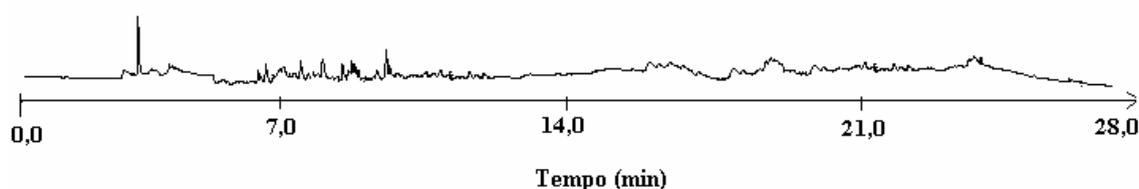


Figura 27 Cromatograma obtido a partir da MEFS-ID/CGAR/DCE em amostra de água de torneira não fortificada $t_E = 20$ min sob agitação a 1.200 rpm; $t_D = 120$ s (250°C)

Como pode ser observado na **Figura 27**, nenhum pico relacionado com os agrotóxicos estudados foi detectado na amostra de água analisada. O mesmo ocorreu com as outras três amostras de água.

Com este estudo, foi possível verificar que nas amostras de águas de consumo analisadas, nenhum dos agrotóxicos estudados foi detectado, provavelmente por não estarem presentes ou devido às suas concentrações estarem abaixo dos limites de detecção do método (décimos de ng/mL).

b. Amostras de alfaces coletadas (São José do Vale do Rio Preto)

As quatro amostras de alface, coletadas em áreas de plantio intenso, foram submetida à extração por MEFS. A etapa de extração (N=3) foi realizada no extrato aquoso de em cada amostra para a verificação da presença de agrotóxicos.

As quatro amostras apresentaram um cromatograma parecido com um pico em tempo de retenção (em média 20,80 min) entre o tempo de retenção de dois dos agrotóxicos organoclorados estudados, DDE e Dieldrin. Para fins ilustrativos, o cromatograma de uma das amostras de alface de cultivo orgânico (amostra O1) pode ser observado na **Figura 28** o surgimento de um pico, cujo tempo de retenção (20,77 min).

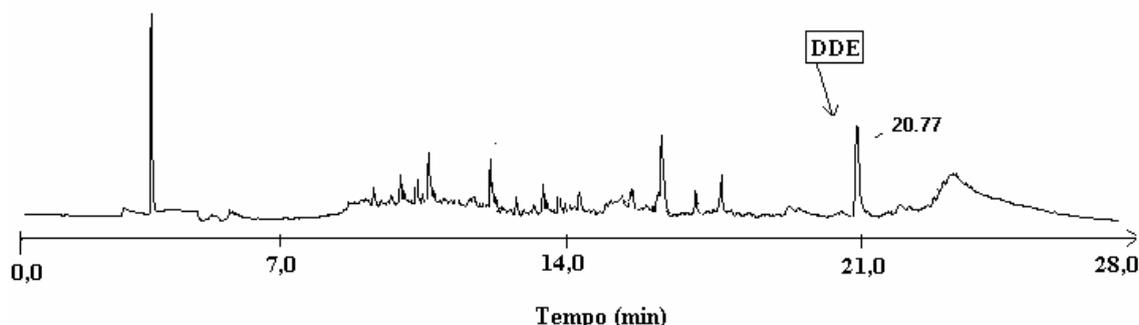


Figura 28 Cromatograma obtido a partir da MEFS-ID/CGAR/DCE em amostra de alface não fortificada $t_E = 20$ min, sob agitação a 1.200 rpm; $t_D = 120$ s (250°C)

3.2.2 ETAPA DE IDENTIFICAÇÃO DO ANALITO DETECTADO NAS AMOSTRAS DE ALFACES COLETADAS (São José do Vale do Rio Preto)

Nesta etapa foram realizadas duas fortificações no extrato aquoso das amostras de alface: uma com solução padrão de Dieldrin em concentração final de 1 ng/mL e outra com DDE em concentração final de 1 ng/mL. Então, foi realizada nova extração por MEFS. Entretanto, no cromatograma obtido com o extrato fortificado com Dieldrin foi observado o surgimento do pico do Dieldrin ao lado do pico suspeito (**Figura 29**).

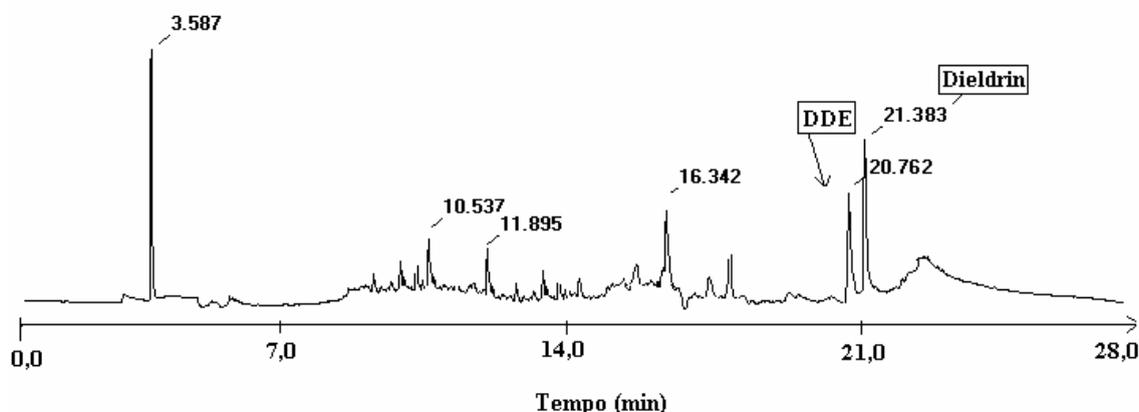


Figura 29 Cromatograma obtido a partir da MEFS-ID/CGAR/DCE em amostra de alface fortificada com Dieldrin a 1 ng/mL ($t_R = 21,38$ min) $t_E = 20$ min, sob agitação a 1.200 rpm; $t_D = 120$ s (250°C)

Porém, no cromatograma obtido com o extrato fortificado com DDE (**Figura 30**) foi observado um aumento na área do pico do agrotóxico organoclorado.

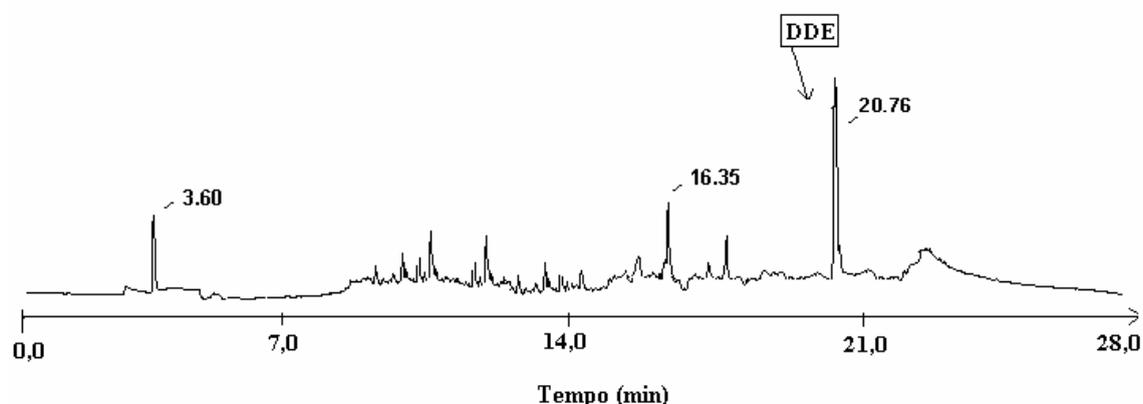


Figura 30 Cromatograma obtido a partir da MEFS-ID/CGAR/DCE em amostra de alface fortificada com DDE a 0,1 ng/mL $t_E = 20$ min, sob agitação a 1.200 rpm; $t_D = 120$ s (250°C)

Comparando os cromatogramas das **Figuras 28 e 30** (obtidos com a mesma amostra sem e com fortificação, respectivamente) pode ser observado que o pico do DDE aumentou com a fortificação, identificando-se assim o DDE como o agrotóxico organoclorado presente nas amostras de alface.

Também foi realizada com injeção do extrato orgânico, das quatro amostras de alface, em CGAR com detector de espectrometria de massas (DEM), comparando-se os tempos de retenção e os espectros de massas obtidos com a amostra e com uma solução padrão de DDE nas mesmas condições. Esta análise foi realizada pelo laboratório de óleos essenciais da Embrapa.

Após confirmação da identificação do DDE nas 4 amostras de alface, as quantificações foram realizadas.

3.2.3 QUANTIFICAÇÃO DO DDE E TESTE DE RECUPERAÇÃO NAS AMOSTRAS DE ALFACES COLETADAS (São José do Vale do Rio Preto)

Determinados componentes da matriz costumam competir com a a fibra na retenção do analito, diminuindo a extração. Isto, geralmente, tem efeito de reduzir a recuperação e elevar o limite de detecção da análise por MEFS. Por isso as amostras de alface foram analisadas por adição padrão.

A) QUANTIFICAÇÃO DO DDE

Para a quantificação de DDE, foi utilizado o método de adição padrão no extrato aquoso de cada amostra. Cada extração por MEFS (N=3) após cada adição de massa, foi realizada sempre no mesmo frasco de extração, do mesmo modo que foi realizado o estudo de linearidade, anteriormente apresentado.

A adição foi realizada com alíquotas de solução padrão de DDE em concentrações finais de 3,0 ; 6,0 e 10 ng/mL no extrato aquoso e a curva de adição padrão determinada para o DDE para cada amostra encontra se na **Tabela 20**.

Tabela 20 Curva de adição padrão de DDE nas amostras de alface analisadas por MEFS-ID/CGAR/DCE

AMOSTRAS DE ALFACE (*)	Curva
O1	$y = 7,05 \text{ E}06 x + 1,35 \text{ E}07$
O2	$y = 8,52 \text{ E}06 x + 5,08 \text{ E}07$
C1	$y = 6,34 \text{ E}06 x + 3,81 \text{ E}07$
C2	$y = 4,32 \text{ E}06 x + 7,54 \text{ E}07$

(*) As amostras O1 e O2 foram obtidas de cultivo orgânico

Com este método foi possível minimizar o efeito da matriz e tornar possível a detecção do DDE mesmo em baixas concentrações. Os resultados obtidos sobre a quantidade de DDE nas quatro amostras estão apresentados na **Tabela 20-A**, com seus respectivos coeficientes de variação.

Tabela 20-A Concentração de DDE nas amostras de alface analisadas por MEFS-ID/CGAR/DCE (N=3) e respectivos coeficientes de variação (CV%)

AMOSTRAS DE ALFACE (*)	DDE	
	ng/g(**)	(CV%)
O1	29	(11,8)
O2	102	(15,8)
C1	92	(13,5)
C2	262	(12,5)

(*) As amostras O1 e O2 foram obtidas de cultivo orgânico

(**) Em ppm, tem-se para cada amostra 0,29; 0,10; 0,09 e 0,26 ppm ($\mu\text{g/g}$)

Na **Tabela 20-A** pode ser observado que o teor de DDE nas amostras variou de 29 a 262 ng/g. Nas amostras O1 e O2 não se esperava encontrar contaminação com agrotóxicos, uma vez que o seu cultivo foi orgânico. Isto indica que a região onde estas amostras foram cultivadas não estava isenta deste agrotóxico.

Estes resultados são importantes, pois direciona e incentiva a pesquisa sobre resíduos de agrotóxicos em alimentos que até então eram negativos, pois não eram detectados por outros métodos.

Os coeficientes de variação foram na faixa de 11,8 a 15,8%. Estes resultados são considerados satisfatórios para análise de traços. Vale lembrar, que associado a este resultado a MEFS foi realizada em soluções aquosas contendo a amostra cuja preparação constou de procedimentos práticos e livres de solventes, com diluição com água de 1:50.

Além do mais, em pouco tempo foi possível analisar, como *screening*, várias amostras por MEFS com objetivo de obter cromatogramas que auxiliassem no delineamento das próximas etapas. A detecção (ou não) de picos suspeitos de serem os de interesse e com uma certa noção da concentração dos mesmos, são informações que a MEFS ofereceu com uma certa rapidez, facilitando a investigação.

B) RECUPERAÇÃO DO DDE NAS AMOSTRAS DE ALFACE COLETADAS (São José do Vale do Rio Preto)

Também foram realizados testes de recuperação nas amostras de alfaces após fortificação com 45; 93 e 133 ng de DDE/g de alface.

Neste item para a determinação da recuperação do método foi considerada a fase da homogeneização, assim, as adições foram realizadas nas amostras logo após a pesagem, para depois seguir o processo de homogeneização e diluição (1:50). Cada amostra foi pesada 3 vezes (uma para cada fortificação) depois homogeneizada diluída e filtrada de onde foram retirados 15,00 mL de extrato aquoso para as extrações por MEFS (N=3), ocorrendo então um total de nove medidas de MEFS (03 para cada fortificação).

As médias das percentagens de recuperação e os respectivos coeficientes de variação (%CV) de cada amostra de alface (obtidos com os 3 níveis de fortificação e em triplicata), após análise por MEFS-ID/CGAR/DCE são apresentados na **Tabela 21**.

Os resultados dos testes de recuperação, acompanhados dos respectivos coeficientes de variação, apresentados na **Tabela 21** indicam que o método proposto, pode ser usado com eficiência na quantificação desta classe de organoclorados em amostras de alface.

As médias obtidas para a recuperação do método proposto ficaram dentro da faixa de 70 a 120 %, aceitável para análise de traços (BRASIL, 2004).

Mais uma vez ficou constatado que o método MEFS-ID/CGAR/DCE para análise de DDE em amostras de alface obtém recuperações de 94 % em média, com coeficiente de variação médio de 14 %.

Tabela 21 Média das percentagens de recuperação de DDE em amostras de alfaces fortificadas, obtidas a partir das 3 fortificações, pelos métodos de extração MEFS e respectivos coeficientes de variação (%CV) (N = 3)

AMOSTRAS DE ALFACE (*)	R (%)	CV (%)
O1	95,89	10,1
O2	93,07	16,5
C1	93,17	14,9
C2	93,14	13,5

(*) As amostras O1 e O2 foram obtidas de cultivo orgânico

3.3 ANÁLISE DE DDE NAS AMOSTRAS DE ALFACE COLETADAS (São José Do Vale Do Rio Preto) PELO MÉTODO CONVENCIONAL (ELL)

Um método de extração convencional ELL, foi usado para determinar também o teor de DDE nas mesmas 4 amostras de alface anteriormente analisadas, para efeitos comparativos. O método escolhido foi adotado como oficial na Holanda (HOLANDA, 1996).

Além da quantificação, foram realizados testes para a validação dos resultados obtidos por este método, como determinação da linearidade, precisão, limites de detecção e recuperação dos analitos.

3.3.1 ETAPA DA EXTRAÇÃO DO MÉTODO CONVENCIONAL ELL

As extrações por ELL nas 04 amostras coletadas (São José do Vale do Rio Preto) para análise foram realizadas conforme procedimento descrito em material e métodos (**item 2.2.4** deste Capítulo).

Foi um procedimento de extração relativamente simples em relação aos outros convencionais disponíveis, porém, mais laborioso e demorado do que o realizado por MEFS. Neste procedimento, a etapa de evaporação do solvente foi realizada através da aplicação de N₂, em capela. Nesta etapa por maior cuidado que se tenha, o odor do solvente hexano é sentido.

Dentre os vários métodos ELL existentes, este foi o escolhido por ser o constituído de menor número de etapas, menor consumo de solvente e não utilizar aquecimento para evaporação de solvente.

Após extração e concentração uma alíquota de 1,8 µL do extrato orgânico foi injetada. As condições cromatográficas foram idênticas a MEFS com exceção do *splitless* que foi de 0,8 min, enquanto que em MEFS foi de 2 min.

Como o ocorrido na MEFS, as quatro amostras de alface analisadas por este método também detectou a presença de pico com tempo de retenção semelhante.

No cromatograma apresentado na **Figura 31** pode ser observado que, após procedimento ELL e análise por CGAR/DCE, que o pico de DDE também foi detectado no extrato orgânico de alface (O1).

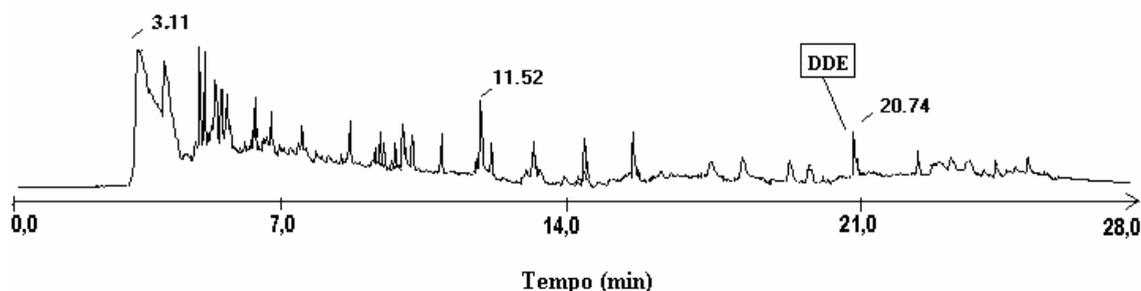


Figura 31 Cromatograma obtido a partir da ELL/CGAR/DCE em amostra de alface não fortificada

Como ocorreu com a análise por MEFS, um pico suspeito de $t_R = 20,74$ minutos surgiu, o que conduziu a etapa de confirmação como descrito a seguir.

3.3.2 ETAPA QUALITATIVA POR ELL – CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE DDE NAS ALFACES (São José do Vale do Rio Preto)

Esta etapa teve como procedimento inicial a co-injeções para confirmar o surgimento do pico de Dieldrin, adjacente ao DDE.

O procedimento de co-injeção foi realizado com adição de uma pequena alíquota de solução padrão de Dieldrin no extrato orgânico antes de injetá-lo novamente, sem fins quantitativos. Este procedimento foi realizado com todas as quatro amostras de alface.

A co-injeção resultou em surgimento de pico adjacente, confirmando o que foi observado na análise por MEFS.

Um dos cromatogramas obtidos pode ser observado na **Figura 32**.

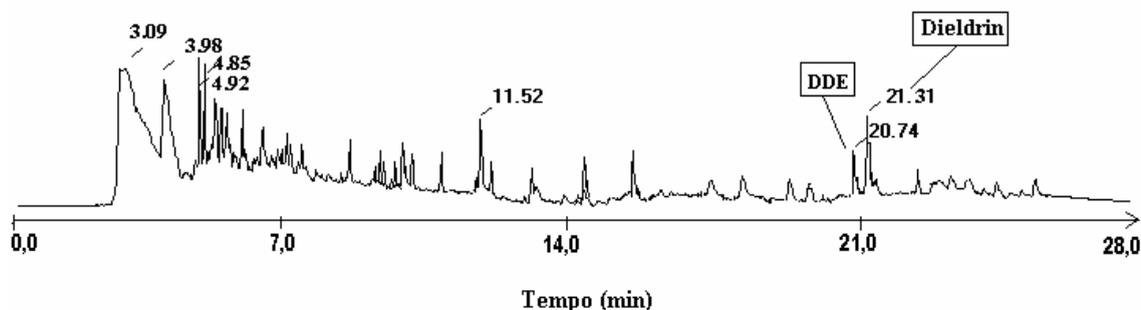


Figura 32 Cromatograma do extrato de alface obtido por ELL, após co-injeção com Dieldrin ($t_R = 21, 31$ min) e análise por CGAR/DCE, indicando a presença de DDE ($t_R = 20,74$ min) como contaminante

Mais uma vez, então, ficou confirmado que o Dieldrin não estava presente em nenhuma das 4 amostras analisadas.

Uma nova co-injeção, agora, com DDE foi realizada. Após co-injeção com DDE o pico foi aumentado. Este procedimento teve que ser realizado nas quatro amostras para confirmação.

A **Figura 33** mostra pico aumentado obtido por co-injeção do extrato correspondente a amostra de alface O1.

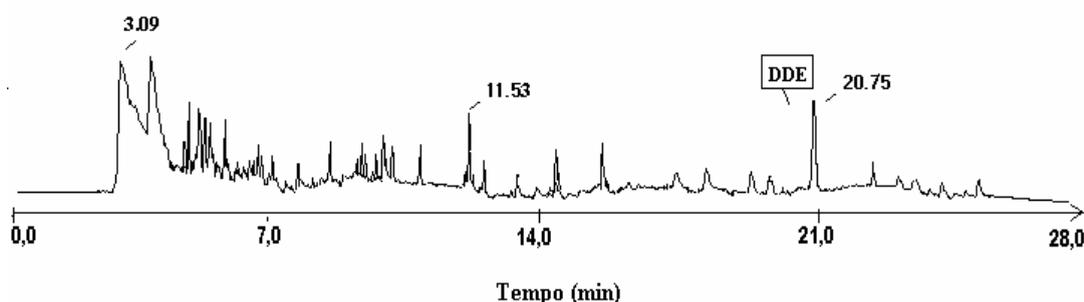


Figura 33 – Cromatograma obtido a partir da ELL/CGAR/DCE em amostra de alface fortificada com DDE

Comparando o cromatogramas das **Figuras 31 e 33**, obtidos com o extrato orgânico da mesma amostra O1 (sem e com co-injeção de DDE, respectivamente) pode ser observado que o pico de DDE na **Figura 33** aumentou com a co-injeção.

Mais uma vez ficou constatado que o DDE estava presente nas amostras de alface.

3.3.3 PARÂMETROS QUANTITATIVOS DO MÉTODO ELL – LINEARIDADE, PRECISÃO E LIMITE DE DETECÇÃO PARA ANÁLISE DE DDE EM ALFACE

A partir do momento que se confirmou somente a presença do DDE, uma curva de adição padrão para determinação da linearidade do método convencional ELL foi construída, mas esta etapa foi realizada somente em uma amostra, a de alface isenta de DDE (Ponta Negra)

O melhor procedimento para a construção da curva foi estudado, pois o método não descrevia a sua realização.

Após alguns testes, estabeleceu-se a construção da curva através da análise dos extratos após adição de solução padrão de DDE na penúltima etapa da extração ELL, como descrito a seguir.

Do mesmo balão volumétrico, foram separadas várias alíquotas de 1,00 mL do extrato orgânico para pequenos frascos. Em seguida, em cada um destes frascos acrescentou-se uma quantidade de solução padrão de DDE e evaporou-se todo o solvente por passagem de nitrogênio. Após a evaporação foram adicionados 1,0 mL de hexano. As adições finalizaram em concentrações de DDE de 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 35,0 ng/mL. As injeções de 1,8 µL foram realizadas em triplicata.

A equação da reta obtida foi $y = 3,91 E4 x + 5,40 E4$ e o respectivo coeficiente de correlação foi $r = 0,9986$.

A precisão do método convencional ELL foi determinada por medidas, com sete repetições das injeções, do extrato de alface fortificado (como descrito acima) a 3,0 ng/mL e a 10 ng/mL, obtendo-se os valores de 20,0 e 10,4%, respectivamente.

Os resultados obtidos para a precisão pela extração convencional ELL confirmam o esperado para um método oficial.

3.3.4 QUANTIFICAÇÃO DE DDE E TESTE DE RECUPERAÇÃO POR ELL NAS AMOSTRAS DE ALFACES

A) QUANTIFICAÇÃO DO DDE, POR ELL, NAS AMOSTRAS DE ALFACES (São José do Vale do Rio Preto)

O método de adição padrão foi utilizado para determinação da quantidade de DDE, nas quatro amostras de alfaces coletadas para análise, utilizando a técnica de extração convencional ELL. Neste processo poderia ter sido usada uma curva de calibração interna ou externa, mas optou-se pelo método de adição padrão devido a sua praticidade e para maior aproximação dos procedimentos realizados para a extração por MEFS.

Foram quatro curvas construídas, uma para cada amostra, seguindo os mesmos procedimentos para linearidade, com concentração de DDE adicionada de 5 ; 10 e 15 ng/mL, com medidas (injeções) em triplicata. Cada ponto da curva representou a média das áreas nas respectivas concentrações.

Na **Tabela 22**, são apresentados estes valores com seus respectivos coeficientes de variação.

Os níveis encontrados de DDE nas amostras de alface foram na faixa de 25 a 240 ng DDE/g de alface (**Tabela 22**) e são semelhantes aos resultados encontrados com o método MEFS.

Tabela 22 Concentração de DDE nas amostras de alface analisadas por ELL (N=3) e respectivos coeficientes de variação (%CV)

AMOSTRAS DE ALFACE (*)	DDE	
	(ng/g)	(CV %)
O1	25	(12,0)
O2	93	(10,6)
C1	91	(12,6)
C2	240	(15,8)

(*) as amostras O1 e O2 foram obtidas de cultivo orgânico

B) RECUPERAÇÃO DO MÉTODO ELL NA ANÁLISE DE DDE NAS AMOSTRAS DE ALFACE (São José do Vale do Rio Preto)

Para os testes de recuperação, cada amostra de alface foi fortificada com 45; 93 e 133 ng/g de DDE. Aqui, a fortificação foi realizada na amostra após pesagem.

A média das percentagens de recuperação das 3 fortificações, em cada amostra (e os respectivos coeficientes de variação – CV%), obtidas pelo método de extração ELL, são apresentados, também, na **Tabela 23**.

Tabela 23 Média das percentagens de recuperação de DDE em amostras de alfaces fortificadas, obtidas a partir das 3 fortificações, pelos métodos de extração ELL e respectivos coeficientes de variação (CV%) (N = 3)

AMOSTRAS DE ALFACE (*)	% R	CV(%)
O1	98	10,8
O2	95	9,81
C1	92	13,8
C2	92	16,6

(*) as amostras O1 e O2 foram obtidas de cultivo orgânico

Como era de se esperar para um método oficial, a recuperação do método ELL ficou dentro da faixa de 70 a 120 %, aceitável para análise de traços (BRASIL, 2004).

3.4 COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO MEFS E ELL PARA MATRIZ ALFACE

3.4.1 COMPARAÇÃO ENTRE AS QUANTIFICAÇÕES DO DDE NAS AMOSTRAS DE ALFACE (São José do Vale do Rio Preto)

As concentrações dos resíduos de DDE e seus respectivos coeficientes de variação, encontrados nas 4 amostras de alface, analisadas pelos dois métodos: ELL/CGAR/ECD e MEFS-ID/CGAR/ECD estão apresentadas na **Tabela 24**.

Com os dados das concentrações (tabela 24) foi realizada uma regressão. Deste modo considerando os valores das concentrações obtidas por MEFS como variáveis “y” e os da extração ELL como “x” obteve-se: $MEFS = - 0,728 (\pm 2,72) + 1,09 (\pm 0,22) ELL$ e para esta equação obteve-se $r = 0,9994$ e $r^2 = 0,9988$. A regressão linear observada entre os dois métodos foi tal que se observa que a correlação entre os dois métodos é cerca de 1 (correlação máxima), o que indica a um nível de 95% de confiança que os métodos não diferem entre si.

Tabela 24 Comparação entre os valores médios dos teores (N=3) de DDE em alface obtidos pelos métodos de extração por MEFS e ELL

AMOSTRAS DE ALFACE	MEFS		ELL	
	ng/g	%CV	ng/g	%CV
O1	29	11,8	25	12,0
O2	102	15,8	93	10,6
C1	92	13,5	91	12,6
C2	262	12,5	240	15,8

(*) As amostras O1 e O2 foram obtidas de cultivo orgânico

Isto indica que o método proposto pode ser uma alternativa para análise deste agrotóxico em amostras de alface.

Como esta técnica de extração foi adotada como oficial (HOLANDA, 1996) e como produziu resultados que não são significativamente diferentes dos obtidos pela técnica da MEFS, confirma-se mais uma vez que esta última técnica pode ser usada para quantificação, podendo até mesmo ser adotada como oficial.

3.4.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS RECUPERAÇÕES PARA ANÁLISE DE DDE EM ALFACE

As percentagens de recuperação obtidas nas mesmas condições para os dois métodos, ELL e MEFS, para cada amostra (e os respectivos coeficientes de variação - %CV), são apresentados na **Tabela 25**.

Comparando as médias das recuperações e respectivos coeficientes de variação, obtidas pelos dois métodos, verifica-se que os resultados foram semelhantes, não ocorrendo diferenças significativas. Vale lembrar, que o método proposto, entre outras vantagens, é mais prático do que o método ELL além de não consumir solvente.

Com estes resultados, fica mais evidente que a análise por MEFS pode ser realizada com sucesso, com resultados próximos ao proposto pelo método convencional.

Tabela 25 Valores médios das recuperações de DDE em amostras de alfaces fortificadas, obtidos a partir das 3 fortificações, pelos métodos de extração por MEFS e ELL e respectivos coeficientes de variação (%CV)

AMOSTRAS DE ALFACE	MEFS		ELL	
	%R	%CV	%R	%CV
O1	96	(10,1)	97	(10,8)
O2	93	(16,5)	95	(9,81)
C1	93	(14,9)	92	(13,8)
C2	93,	(13,5)	92	(16,6)

(*) As amostras O1 e O2 foram obtidas de cultivo orgânico

3.4.3 COMPARAÇÃO ENTRE LINEARIDADE, PRECISÃO E LIMITE DE DETECÇÃO NA ANÁLISE DE DDE EM ALFACE, POR MFES E ELL

Os valores médios de linearidade, precisão e limites de detecção, obtidos para os dois métodos propostos para análise de DDE, em amostras de alface fortificadas, são apresentados na **Tabela 26**.

Tabela 26 Comparação de linearidade, precisão e limite de detecção (L.D.) entre os métodos MEFS e ELL aplicado na determinação de DDE em alface

MÉTODO	CV(%)	EQUAÇÃO $Y = ax + b$	r	L.D.
ELL	20,0% ^(a)	$y = 3,91 E04 x + 5,40 E04$	0,9986	1,13 ng/mL ^(a)
MEFS-ID	9,28% ^(b)	$y = 5,14 E06 x - 2,73 E06$	0,9961	0,091 ng/mL ^(b)

(a) e (b) alface fortificada a 0,5 ng/mL (N = 7)

y = área; a = coeficiente angular; x= concentração em ng/mL; b = coeficiente linear

O L.D. obtido com o método MEFS é dez vezes menor que com o método ELL (**Tabela 26**), tem maior sensibilidade (coeficiente angular) e precisão (%CV), além de

ter as seguintes vantagens: a extração foi mais rápida (20 minutos contra 60 minutos), não necessitou de uso de solvente e manipulou-se menor quantidade de vidrarias o que é muito importante para análise de rotina de resíduos de agrotóxicos, considerando que para isto existe a necessidade de métodos alternativos que sejam mais rápidos e tão ou mais sensíveis que o método de extração convencional ELL.

A presença de DDE como contaminante pode estar relacionada com a aplicação de DDT em vez do próprio DDE, pois o DDT foi utilizado mundialmente em larga escala até 1985, quando o seu uso foi proibido no Brasil. Segundo Yokomizo e colaboradores (1986) há insetos que desenvolveram resistência ao DDT e são capazes de convertê-lo em DDE através de processos enzimáticos. Os resultados obtidos refletem que a existência de agrotóxicos organoclorados no ambiente pode ser devido ao transporte na atmosfera sem degradação significativa., como ocorreu em amostras de neve e gelo do ártico Canadense, entre maio de 1993 e 1994, que apresentaram concentrações de Dieldrin, Aldrin, Lindano e outros agrotóxicos (BOY – BOLAND et al, 1996).

4 CONCLUSÕES

- 1) A validação do método MEFS proposto (MEFS-ID/CGAR/DCE) indicou que as condições de extração, dessorção e cromatográficas de análise para determinação de agrotóxicos organoclorados em amostras de água e alface foram otimizadas com sucesso.
- 2) O método mostrou-se adequado para determinar os pesticidas (organoclorados) estudados em águas em concentrações médias de 0,50 a 3,5 mg/mL (faixa validada na solução-amostra), cujo teste de recuperação apresentou um resultado de 98,7 a 108 %.
- 3) O método mostrou-se também adequado para determinar os pesticidas (organoclorados) estudados em alfaces em concentrações médias de 1,20 a 36,8 mg/mL (faixa validada na solução-amostra), com recuperações também apropriadas de 92,0 a 111 %.
- 4) A diluição 1:50 com água, para a matriz alface, mostrou-se adequada para a aplicação do método proposto.
- 5) A matriz alface, provavelmente por ser pobre em matéria graxa, não indicou ser um fator adverso à extração por MEFS.
- 6) Com exceção do Mirex, o método proposto apresentou coeficientes de variação na faixa de 1,1 a 10% na análise dos agrotóxicos estudados em água, e de 7,7 a 11% em alface ao nível de 0,5 e 0,6 ng/mL, respectivamente.
- 7) As correlações (r) médias obtidas com as curvas (maiores do que 0,995 para todos os agrotóxicos, não incluindo o Mirex) indicam que a adição padrão também é aplicável para análise por MEFS.
- 8) Os limites de detecção do método, quando aplicado em amostras de água, foram de centésimos de ng/mL para o Lindano, Aldrin e Dieldrin e décimos de ng/mL para o TDE e Mirex, indicando ser aplicável na análise de resíduos em água.
- 9) A análise do Lindano, Aldrin, DDE, Dieldrin e do Mirex em amostras de alfaces podem ser realizadas por MEFS com sucesso em concentrações mínimas de décimos de mg/mL.
- 10) Comparações entre os métodos, indicaram que o limite de detecção para análise de DDE, usando a técnica MEFS foi dez vezes maior do que usando a ELL, considerando a fortificação de 0,5 ng/mL com precisões de 9,28 e 20,01%, respectivamente.
- 11) As recuperações obtidas pelos dois métodos na análise de DDE na alface em concentrações de 45, 93 e 133 ng DDE/g alface não foram significativamente diferentes entre si.
- 12) A quantificação do DDE nas amostras de alface pelos métodos ELL e MEFS conduziu a resultados que não se diferenciaram significativamente, indicando contaminações por este agrotóxico organoclorado de 24,7 a 262 ng/mL.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, A.; PEÑALVER, E.; POCURULL, E.; FERRÉ, F.; BORRULL, R.M. MARCÉ. Optimization of spme conditions using a response methodology to determine organochlorine pesticides surface methodology to determine organochlorine pesticides in water by gas chromatography and electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, v.844, n.425-432, 1999.

ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. Principles of Data Quality Control in Chemical Analysis. *Analyst*, v.114, p. 1497 – 1503, 1989.

BOYD-BOLAND, A.; MAGDIC S.; PAWLISZYN, J. B. Simultaneous determinations of 60 pesticides in water using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst*, v.121, p.929-938, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). [2004]. Disponível em:<[http:// www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 05 ab. 2004.

COLLINS C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, S. P. *Introdução a métodos cromatográficos*. 6.ed. Campinas: Ed. Unicamp, 1996. 279 p.

GOMES, F.P. *Curso de estatística experimental*. 14. Ed. Piracicaba: Ed. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000. 477p.

HOLANDA. Ministry of Public Health, Welfare and Sport. Analytical methods for pesticide residues in foodstuffs. 6.Ed. Netherland: Ed. Van Zoonen, P. Part I, p.4. 1996.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial, Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008. 35p. Mar. 2003.

IUPAC. Analytical methods committee – Recommendations for definitions, estimation and used of the detection limits. *Analyst*, v.112, p.199-204, 1987.

LEITE, F. *Validação em análise química*. 3.ed. Campinas: Ed. Átomo, 1998, 224p.

MAGDIC, S.; PAWLISZYN, J. Analysis of organochlorine pesticides using SPME, *Journal of Chromatography A*, v.723, p.111-122, 1996.

MILLER, J.C.; MILLER, J.N. *Estatística para química analítica*. 2.ed. Delaware: Ed. Addison-Wesley Iberoamerican, 1993, 211p.

NOBRE, A. LR. *Determinação de metais em méis por voltametria de redissolução anódica e adsortiva*. 1990. 182p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Química e Física Molecular, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1990.

PAWLISZYN, J. *Solid phase microextraction – Theory and practice*. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1997. 247p.

SIMPLÍCIO, A. L.; VILAS BOAS, L. Validation of a SPME method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. *Journal of Chromatography A*, v.833, p.35-42, 1999.

SOUZA CRUZ. Protocolo mínimo para validação de métodos analíticos. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento. Fev. 2003, 11p.

SUPELCO. Manual de instruções.2003.

YOKOMIZO, Y.; LARA, W. H.; PUGA, F.; BATISTA, G.; CARVALHO, P. R. N.; BARRETO, H. C.; MALTONE, C. A.; DOEGE, M. *Resíduos de pesticidas em alimentos*. Campinas:Ital, 1985. 226p.

CONCLUSÃO

A metodologia que utiliza a micro-extração em fase sólida (MFES) para determinação dos agrotóxicos (Lindano, Aldrin, DDE, Dieldrin, TDE e Mirex) em amostras de água e alface por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (CG-DCE) é simples, eficiente e econômica. Outras vantagens do método são: pode ser aplicado a pequenos volumes de amostra (em torno de 1,0 mL), não necessita de uso de solventes e para análise multi-resíduo não há necessidade de modificar a força iônica ou o pH da matriz. Uma fibra ótica revestida com polimetilsiloxano (PDMS) com espessura de μm foi utilizada como fase extratora para a extração por MEFS. Após contato entre a fibra e a solução, os analitos são adsorvidos e simultaneamente concentrados, sem a necessidade de calor.

Os diferentes parâmetros (tempo de extração, tempo de dessorção, efeito da agitação, da força iônica, e do pH) que controlam a extração foram estudados. A metodologia desenvolvida tem um limite de detecção na faixa de 100 a 300 ppt e de 90 a 550 ppt para a água e alface, respectivamente. A linear de trabalho foi de 0,5 a 3,5 ng/mL para a água e de 0,6 a 37 ng/mL para a alface. A precisão do método, entre 1 – 10%, foi obtido de sete determinações independentes da mesma amostra de água contendo 0,5 ng/mL e de 8 – 11 % foi obtido de sete determinações independentes da mesma amostra de alface contendo 0,6 ng/mL. A percentagem de recuperação, entre 100 - 108 % para a água e 92 – 108 % para a alface com um coeficiente de variação médio em torno de 11 %. Após otimização, o método foi aplicado na avaliação de agrotóxicos clorados em amostras ambientais reais, água canalizada e alface de plantio convencional e orgânico, da Região de São José do Rio Preto. Após *screening*, foi encontrado DDE nas quatro amostras de alface, na faixa entre 29- 262 ng/g, com % CV médio de 13 %. A exatidão da quantificação de DDE nas amostras de alface foi testada pela percentagem de recuperação e comparação com um método oficial para determinação de agrotóxicos, obtendo-se uma recuperação entre 93- 96 % com %CV médio de 14 %. Pela extração ELL (oficial) foi encontrado um valor de para o DDE nas quatro amostras de alface na faixa de 25 – 240 ng/g, com %CV médio de 14 %, e recuperação entre 92 – 98 %, com CV médio de 12 %. Comparando os dois métodos através da regressão linear, observa-se que eles não diferem estatisticamente entre si, a um nível da confiança de 95 %.

A presença de DDE como contaminante pode estar relacionada com a aplicação de DDT em vez do próprio DDE, pois o DDT foi utilizado mundialmente em larga escala até 1985, quando o seu uso foi proibido no Brasil. O resultado obtido para as amostras de alface é indicativo de persistência ambiental de agrotóxicos organoclorados.