



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



1150060832



IQ

T/UNICAMP R618p

PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EM PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS

Tese de doutorado apresentada
por **Marili Villa Nova Rodrigues** ao
Programa de Pós-Graduação em
Química do Departamento de Química
Analítica da Universidade Estadual de
Campinas, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Campinas, Julho de 2004.

UNIDADE	<u>F. Q.</u>
Nº CHAMADA	<u>1/00-55</u>
	<u>R618p</u>
V	Ex
TOMBO BCI	<u>60832</u>
PROC.	<u>16-917-04</u>
C	☐
D	☒
PREÇO	<u>11,00</u>
DATA	<u>19-12-04</u>
Nº CPD	

B.b Id 33142

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

R618p

Rodrigues, Marili Villa Nova.

Pesticidas organoclorados em plantas medicinais e fitoterápicos / Marili Villa Nova Rodrigues. -- Campinas, SP: [s.n], 2004.

Orientadora: Susanne Rath.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Pesticidas organoclorados. 2. Plantas medicinais. 3. SPME. 4. GC-MS. I. Rath, Susanne. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

À você Ró,

Por todas as experiências que temos compartilhado durante estes 15 anos, que valeram a pena e nos fizeram amadurecer.

Te amo muito!

Ao meu pai (Antonio),

Pela presença constante em todos os momentos da minha vida.

Minha eterna gratidão!

Agradecimentos

- ❖ À profa. Susanne, uma pessoa admirável que serve de exemplo pelo seu amor à profissão, dedicação e competência. Sem dúvida alguma, uma excelente amiga, que transborda generosidade e simpatia. Foi uma honra tê-la como orientadora!
- ❖ Ao prof. Felix, pelas valiosas sugestões, ensinamentos e pelo carinho demonstrado.
- ❖ Aos meus amores Rodney e Sugar, pelo carinho e compreensão nas etapas mais difíceis.
- ❖ À minha querida amiga Vera Rehder pela amizade sincera, ensinamentos e inestimável ajuda desde o início do trabalho.
- ❖ Ao Pedro Melillo pelas preciosas informações e ajuda durante a coleta e secagem das plantas.
- ❖ Ao Adilson, pela amizade e ajuda em todos os momentos.
- ❖ Aos amigos da DQOF que ocupam um lugar especial no coração: Adriana, Lucília, Daniel, Sinésio, Nelson, Ana Paula, Aline, Rafael, Leandro, Amandinha e Rodolfo.
- ❖ À Diretoria do CPQBA - UNICAMP e todo o pessoal da Administração, Agrotecnologia e Manutenção que deram apoio à realização deste trabalho.
- ❖ Um agradecimento especial aos amigos: João Ernesto e Mario Donalizio (pelas sugestões na fase inicial do projeto), André Lins da Informática, Alê, Marta, Edil, Glyn, Mariana, Ilza, Renata, Carmen, Célio e Damaris, pela amizade e apoio.
- ❖ Ao IQ - UNICAMP pelas excelentes instalações e a todo pessoal de apoio.
- ❖ Ao prof. Zezzi e seus alunos que ajudaram com os ensaios do microondas.
- ❖ À todo o nosso grupo de trabalho (Laboratório de Analítica do IQ e Laboratório de Toxicologia da FEA) pela agradável convivência e colaboração mútua.
- ❖ Às Instituições: FAPESP, FAEP e CETESB-SP.

Muito obrigada!!!

CURRICULUM VITAE

1. Formação Acadêmica:

- Doutorado em Ciências (Química Analítica)
“ Pesticidas Organoclorados em Plantas Medicinais e Fitoterápicos”, 2004, sob orientação da Profa. Dra. Susanne Rath.
- Mestrado em Tecnologia de Alimentos – FEA / UNICAMP
“Otimização da produção de xarope de açúcar invertido através do uso de resinas de troca-iônica”, 1997, sob orientação da Profa. Dra. Telma Teixeira Franco
- Graduação em Farmácia Indústria pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, 1987.

2. Artigos a serem submetidos:

RODRIGUES, M.V.N.; REYES, F.G.R.; MAGALHÃES, P.M.; RATH, S. A method for the determination of organochlorine pesticides residues in medicinal plant infusion by SPME-GC-MS.

RODRIGUES, M.V.N.; REYES, F.G.R.; REHDER, V.L.G.; RATH, S. Organochlorine pesticide in brazilian medicinal plants infusions.

3. Artigos Publicados:

REHDER, V.L.G.; RODRIGUES, M.V.N.; SARTORATTO, A.; FOGLIO, M.A. Dosagem de artemisinina em *Artemisia annua* L. por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por índice de refração. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 116-118, 2002.

RODRIGUES, R.A.F.; QUEIROGA, C.L.; RODRIGUES, M.V.N.; FOGLIO, M.A.; MONTANARI JÚNIOR, I. Study of the variation of the composition of the essential oil of leaves and flowers of *Achyrocline alata* (DC) along a period of the day. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, p. 280-281, 2002.

SIMÕES, R.P.; GROPPPO, F.C.; SARTORATO, A.; DEL FIOLE, F.S.; MATTOS FILHO, T.R.; RAMACCIATO, J.C.; RODRIGUES, M.V.N. Efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre a infecção estafilocócica. **Revista Lacta**, v. 20, n. 2, p. 143-152, 2002.

RODRIGUES, M.V.N.; RODRIGUES, R.A.F.; SERRA, G.E.; ANDRIETTA, S.R.; FRANCO, T.T. Produção de xarope de açúcar invertido obtido por hidrólise heterogênea, através de planejamento experimental. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 103-109, 2000.

ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; RODRIGUES, M.V.N.; HOKKA, C.O.; SERRA, G.E. Selection of industrial complex medium for cephalosporin C production. **Revista de Microbiologia**, São Carlos, v. 6, n. 1, p. 109-113, 1997.

RODRIGUES, M.V.N.; SERRA, G.E. Determinação de resíduos de 2,4D em amostras vegetais. **Pesticidas – Revista Técnico Científica**, v. 6, p. 99-104, 1996.

4. Resumos apresentados em congressos internacionais: 06

5. Resumos apresentados em congressos nacionais: 17

6. Cursos ministrados: 03

“ Curso básico de cromatografia líquida de alta eficiência” para os alunos do Colégio Técnico de Paulínia nos anos de 2000, 2001 e 2002.

7. Experiência profissional

- CPQBA/UNICAMP – Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica
Função: farmacêutica (07/1992 até presente data)
- CODETEC - Companhia de Desenvolvimento Tecnológico
Função: assistente de pesquisa (01/1988 – 07/1992)

RESUMO

“PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EM PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS”.

Autora: Marili Villa Nova Rodrigues

Orientadora: Profa. Dra. Susanne Rath

A contaminação de plantas por pesticidas, tanto para fins medicinais como alimentares, é muito comum, podendo ser decorrente do próprio cultivo em larga escala, por migração de culturas vizinhas ou provenientes da contaminação ambiental. Embora banidos de muitos países, inclusive o Brasil, devido à sua alta toxicidade e persistência ambiental, os pesticidas organoclorados (OCP) continuam amplamente distribuídos no planeta. Dependendo do processamento destas plantas, os pesticidas quando presentes, podem ter seus níveis aumentados ou reduzidos. Neste trabalho a metodologia proposta para quantificação dos OCP (hexaclorobenzeno, lindano, heptacloro, heptacloro epóxido, aldrin, dieldrin, endrin, 4,4'-DDE e 4,4'-DDT) em folhas de guaco, espinheira santa e erva baleeira foi a cromatografia gasosa com detetor seletivo de massas (GC-MS), empregando para tanto uma coluna capilar HP-5MS operando a 90 °C/1 min (12 °C min⁻¹) 150 °C/ 1 min (2 °C min⁻¹) 230 °C/ 3 min (10 °C min⁻¹) 275 °C/ 25 min. Duas técnicas de extração dos OCP das folhas foram avaliadas, a extração assistida por microondas e a extração com solventes. Também foi estabelecida uma metodologia analítica para quantificação dos OCP na infusão destas plantas através do emprego da técnica de SPME-GC-MS utilizando a fibra de PDMS sob imersão direta na solução amostra (90 min a 50 °C), condição esta otimizada através da metodologia de superfície de resposta. Os métodos para quantificação dos OCP em folhas e na infusão foram devidamente validados e aplicados para análise de amostras de diferentes procedências, incluindo as plantas cultivadas numa região com altos níveis de contaminação.

ABSTRACT

“ORGANOCHLORINE PESTICIDES IN MEDICINAL PLANTS AND PHYTOTHERAPICS”

Author: Marili Villa Nova Rodrigues

Supervisor: Profa. Dra. Susanne Rath

The pesticide contamination of plants as medicinal or food uses is very common, and could be due to the own cultivation in large scale, migration of neighboring cultures or the environmental contamination. Although banished of many countries, besides Brazil, due to its high toxicity and environmental persistence, the organochlorine pesticides (OCP) continue thoroughly distributed in the planet. Depending on the processing of these plants, the pesticides when present, can have its levels increased or reduced. In this work the methodology proposed for quantification of OCP (hexachlorobenzene, lindane, heptachlor, heptachlor epoxide, aldrin, dieldrin, endrin, 4,4'-DDE and 4,4'-DDT) in leaves of *Mikania sp*, *Maytenus ilicifolia* and *Cordia curassavica* was gas chromatography with mass detector (GC-MS) using HP-5MS capillary column operating to 90 °C/1 min (12 °C min⁻¹) 150 °C/1 min (2 °C min⁻¹) 230 °C/3 min (10 °C min⁻¹) 275 °C/25 min. Two extraction techniques for OCP quantification in leaves were evaluated, the microwave assisted extraction combined with solid-phase microextraction (MAE-SPME) and the solvent extraction with solid-phase extraction (SPE). The analytical methodology was also established for OCP quantification in the infusion of these plants through the employment of the SPME-GC-MS technique by direct immersion of the PDMS fiber in the sample solution (90 min to 50 °C). This condition was optimized by response surface methodology. The methods for OCP quantification in leaves and in the infusion were validated and applied in samples of different origins including the plants cultivated in an area with high levels of contamination.

ÍNDICE GERAL

<i>Descrição</i>	<i>Página</i>
CURRICULUM VITAE	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
ÍNDICE GERAL	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
LISTA DE TABELAS	xxv
LISTA DE FIGURAS	xxviii
APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE TESE	01
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	03
I.1 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS E MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS	05
I.1.1 CONTAMINAÇÃO POR PESTICIDAS	08
I.2 PESTICIDAS ORGANOCLORADOS	09
I.3 ANÁLISE DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS	14
I.3.1 PREPARO DE AMOSTRA	15
I.3.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	18
I.3.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	21
I.3.3.1 EXATIDÃO	21
I.3.3.2 PRECISÃO	22
I.3.3.3 SELETIVIDADE	22
I.3.3.4 LIMITE DE DETECÇÃO	23
I.3.3.5 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	23
I.3.3.6 SENSIBILIDADE	24

I.3.3.7 LINEARIDADE	24
I.3.3.8 FAIXA LINEAR	24
I.3.4 LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO (LMR)	24
 CAPÍTULO II – OBJETIVOS	27
II.1 OBJETIVOS GERAIS	29
II.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
 CAPÍTULO III – MATRIZES VEGETAIS	31
III.1 INTRODUÇÃO	33
III.2 EXPERIMENTAL	39
III.2.1 MATERIAL VEGETAL	39
III.2.2 EQUIPAMENTOS	40
III.2.3 COLETA E SECAGEM DAS PLANTAS CULTIVADAS EM PAULÍNIA	40
 CAPÍTULO IV – ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA DETERMINAÇÃO DOS PESTICIDAS ORGANOCLORADOS POR GC-MS	45
IV.1 INTRODUÇÃO	47
IV.2 OBJETIVOS	48
IV.3 EXPERIMENTAL	48
IV.3.1 INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	48
IV.3.2 PADRÕES ANALÍTICOS	49
IV.3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO	49
IV.3.4 CURVAS ANALÍTICAS	53
IV.4 RESULTADOS	53
IV.4.1 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS NO GC-MS	53
IV.4.2 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO	65
IV.5 CONCLUSÕES	69

CAPÍTULO V – AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROCESSOS DE EXTRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE OCP EM PLANTAS MEDICINAIS	71
V.1 INTRODUÇÃO	73
V.1.1 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)	75
V.2 OBJETIVOS	79
V.3 EXPERIMENTAL	79
V.3.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	79
V.3.2 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS	80
V.3.3 MATERIAL PARA SPME	80
V.3.4 EQUIPAMENTOS	81
V.3.5 INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	83
V.3.6 TRATAMENTO DOS DADOS ESTATÍSTICOS	84
V.4 PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE SPE	84
V.4.1 PREPARO DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA SPE	85
V.4.2 ANÁLISE DE AMOSTRAS UTILIZANDO SPE	85
V.4.3 ENSAIO DE RECUPERAÇÃO	86
V.5 PROCEDIMENTO PARA AVALIAÇÃO DA TÉCNICA MAE-SPME-GC-MS	86
V.5.1 PROCEDIMENTO PARA OTIMIZAÇÃO DA MAE	86
V.5.2 PROCEDIMENTO PARA OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SPME-GC-MS	88
V.6 RESULTADOS	90
V.6.1 AVALIAÇÃO DO MÉTODO UTILIZANDO A TÉCNICA DE SPE	90
V.6.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO UTILIZANDO A TÉCNICA DE MAE	97
V.6.2.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS DA SPME	97
V.6.2.2 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICROONDAS (MAE)	104
V.6.3 ANÁLISE DAS PLANTAS PROVENIENTES DE PAULÍNIA	106
V.6.4 ANÁLISE DAS PLANTAS DE DIFERENTES FORNECEDORES COMERCIAIS	109
V.7 Conclusões	110

CAPÍTULO VI – DETERMINAÇÃO DE OCP EM INFUSÕES E ESTUDO DA TAXA DE TRANSFERÊNCIA	113
VI.1 INTRODUÇÃO	115
VI.2 OBJETIVOS	116
VI.3 EXPERIMENTAL	116
VI.3.1 MATERIAL VEGETAL	116
VI.3.2 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS	116
VI.3.3 MATERIAL PARA SPME	117
VI.3.4 INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	117
VI.4 PROCEDIMENTOS	118
VI.4.1 PREPARO DAS INFUSÕES	118
VI.4.2 FORTIFICAÇÃO DO GUACO PARA AVALIAR A TAXA DE TRANSFERÊNCIA	118
VI.4.3 PROCEDIMENTO ANALÍTICO	119
VI.5 RESULTADOS	119
VI.5.1 ANÁLISE DAS INFUSÕES	120
VI.5.2 EFEITO MATRIZ	120
VI.5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO SPME-GC-MS PARA DOSAGEM DOS OCP NAS INFUSÕES	125
VI.5.4 TAXA DE TRANSFERÊNCIA	127
VI.6 CONCLUSÕES	129
 CAPÍTULO VII – CONCLUSÕES FINAIS	 131
 CAPÍTULO VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 137
 ANEXOS	 149

LISTA DE ABREVIATURAS

BHC	Do inglês “benzene hexachloride”, termo em desuso, mas que refere-se ao composto lindano.
CCPR	Do inglês Codex Committee on Pesticide Residues Comitê sobre Resíduo de Pesticidas
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CPQBA-UNICAMP	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – Universidade Estadual de Campinas
DDE	Do inglês “2,2-bis(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethene” 2,2-bis (p-clorofenil)-1,1-dicloroetileno
4,4'-DDD	Do inglês “[1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane]” [1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano]
DDT	Do inglês “1,1'-(2,2,2-trichloroethylidene)bis[4-chlorobenzene]” 1,1'-(2,2,2-tricloroetilideno)bis[4-clorobenzeno]
ECD	Do inglês “Electron Capture Detector” Detetor de captura de elétrons
EPA	Do inglês “Environmental Protection Agency” Agência de Proteção Ambiental

FAO	Do inglês "Food and Agriculture Organization of the United Nations" Organização das Nações Unidas para agricultura e alimentação
GC	Do inglês "Gas Chromatography" Cromatografia gasosa
GC/ECD	Do inglês "Gas Chromatography/ Electron Capture Detector" Cromatografia gasosa/Detetor de captura de elétrons
GC/ECD/FPD	Do inglês "Gas Chromatography/Electron Capture Detector/ Flame Photometric Detector" Cromatografia gasosa/ Detetor de captura de elétrons/ Detetor fotométrico de chama
GC-MS	Do inglês "Gas Chromatography – Mass Spectrometry" Cromatografia gasosa - Detetor seletivo de massas
GC-MS-MS	Do inglês, "gas chromatography with tandem mass spectrometry" Cromatografia gasosa com detetor seletivo de massas em tandem
HCB	Hexaclorobenzeno
HCH	Do inglês "hexachlorocyclohexane" Hexaclorociclohexano
ICH	Do inglês "International Conference on Harmonization"

IDA	Ingestão Diária Aceitável
II	Íons de Identificação
IQ	Íons de Quantificação
JMPR	Do inglês “ Joint FAO/WHO Meetings on Pesticide Residues” Comitê conjunto FAO/WHO de peritos sobre resíduos de pesticidas.
<i>k</i>	Constante de distribuição
L	Linear
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação ou Limite de Determinação
MAE	Do inglês “Microwave Assisted Extraction” Extração assistida por microondas
MAE-SPME-GC-MS	Do inglês “Microwave Assisted Extraction- Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry” Extração assistida por microondas – Microextração em fase sólida – Cromatografia gasosa – Detetor seletivo de massas
MM	Massa molar
LMR	Limite máximo de resíduo

MSPD	Do inglês “Matrix Solid Phase Dispersion” Dispersão em fase sólida
OCP	Do inglês “Organochlorine Pesticides” Pesticidas organoclorados
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
Q	Quadrático
r	Coeficiente de correlação
RSD	Estimativa do desvio padrão relativo
SFE	Do inglês “Supercritical Fluid Extraction” Extração por fluído supercrítico
SIM	Do inglês “Single Ion Monitoring” Monitoramento por íons simples
SPE	Do inglês “Solid Phase Extraction” Extração em fase sólida
SPME	Do inglês “Solid Phase Microextraction” Microextração em fase sólida

SPME – MAE	Do inglês “Solid Phase Microextraction- Microwave Assisted Extraction” Microextração em fase sólida - Extração assistida por microondas
SPME-GC-MS	Microextração em fase sólida – Cromatografia gasosa – Detetor seletivo de massas
USP 25	Do inglês “United States Pharmacopoeia 25 th edition” Farmacopéia dos Estados Unidos da América 25ª edição
WHO	Do inglês “World Health Organization” Organização Mundial de Saúde

LISTA DE TABELAS

Nº	Descrição	Página
I.1	Estruturas química dos pesticidas organoclorados em estudo.	10
I.2	Tempos de meia-vida aproximados para alguns OCP.	14
I.3	Limites máximos de resíduos de pesticidas organoclorados expressos na Farmacopéia Européia .	26
III.1	Resumo do caso Shell-Paulínia.	38
III.2	Coleta e secagem das plantas.	40
IV.1	Proporções das impurezas obtidas por porcentagem em área (GC-MS) da solução padrão de 4,4'-DDT.	52
IV.2	Íons utilizados na programação do detetor de massas no modo SIM para análise dos OCP.	64
IV.3	Dados obtidos a partir da curva analítica dos OCP.	68
V.1	Planejamento composto central 2 ² completo para otimização das condições de extração dos OCP por MAE.	87
V.2	Ensaio do planejamento experimental para otimização das condições operacionais da fibra de PDMS.	89
V.3	Parâmetros de validação para o método utilizando SPE.	91
V.4	Teste de recuperação (exatidão) para as folhas de guaco.	92
V.5	Ensaio de recuperação (exatidão) para a amostra de espinheira santa.	93
V.6	Ensaio de recuperação (exatidão) para a amostra de erva baleeira.	94

V.7	Respostas em massa recuperada (ng) dos OCP, obtidos no planejamento 2² para otimização das condições de operação da fibra de PDMS.	98
V.8	Quantificação dos OCP nas plantas cultivadas em Paulínia-SP.	107
V.9	Análise dos OCP em folhas de guaco de diferentes procedências.	109
VI.1	Fortificações nas folhas de guaco.	118
VI.2	Sensibilidade do método SPME-GC-MS, comparando a imersão da fibra PDMS na água e na infusão de guaco.	123
VI.3	Parâmetros de validação para SPME-GC-MS aplicado para a infusão de guaco.	125
VI.4	Precisão intra-ensaio na determinação dos OCP por SPME-GC-MS.	126
VI.5	Avaliação da taxa de transferência dos OCP da planta (guaco fortificado) para a infusão.	128
B.1	Estimativa dos efeitos sobre a massa recuperada (ng) de hexaclorobenzeno.	152
B.2	Análise de variância para ajuste do modelo quadrático aos dados obtidos com a Tabela V.7 para o hexaclorobenzeno.	153
B.3	Estimativa dos efeitos sobre a massa recuperada (ng) do lindano.	153
B.4	Análise de variância para ajuste do modelo quadrático aos dados obtidos com a Tabela V.7 para o lindano.	154
B.5	Estimativa dos efeitos sobre a massa recuperada (ng) do heptacloro.	154
B.6	Análise de variância para ajuste do modelo quadrático aos dados obtidos com a Tabela V.7 para o heptacloro.	155
B.7	Estimativa dos efeitos sobre a massa recuperada (ng) do aldrin.	155
B.8	Análise de variância para ajuste do modelo quadrático aos dados obtidos com a Tabela V.7 para o aldrin.	156

B.9	Estimativa dos efeitos sobre a massa recuperada (ng) do heptacloro epóxido.	156
B.10	Análise de variância para ajuste do modelo quadrático aos dados obtidos com a Tabela V.7 para o heptacloro epóxido.	157
B.11	Estimativa dos efeitos sobre a massa recuperada (ng) do dieldrin.	157
B.12	Análise de variância para ajuste do modelo quadrático aos dados obtidos com a Tabela V.7 para o dieldrin.	158
B.13	Estimativa dos efeitos sobre a massa recuperada (ng) do 4,4'-DDE.	158
B.14	Análise de variância para ajuste do modelo quadrático aos dados obtidos com a Tabela V.7 para o 4,4'-DDE.	159
B.15	Estimativa dos efeitos sobre a massa recuperada (ng) do endrin.	159
B.16	Análise de variância para ajuste do modelo quadrático aos dados obtidos com a Tabela V.7 para o endrin.	160
B.17	Estimativa dos efeitos sobre a massa recuperada (ng) do 4,4'-DDT.	160
B.18	Análise de variância para ajuste do modelo quadrático aos dados obtidos com a Tabela V.7 para o 4,4'-DDT.	161

LISTA DE FIGURAS

Nº	Descrição	Página
I.1	Número de monografias de plantas medicinais nas edições da Farmacopéia Brasileira. Fonte: MELLO, 2003.	07
III.1	Foto das folhas de <i>Mikania laevigata</i> , conhecida popularmente como guaco.	33
III.2	Foto das folhas de <i>Maytenus ilicifolia</i> , conhecida popularmente como espinheira santa.	34
III.3	<i>Cordia curassavica</i> (erva baleeira) com inflorescência.	35
III.4	Foto aérea do complexo industrial Shell- Paulínia, mostrando em (1) o rio Atibaia, (2) região de chácaras do bairro Recanto dos Pássaros e (3) o complexo industrial.	37
III.5	Fotos das plantas cultivadas em Paulínia-SP: (A) coleta da espinheira santa em hastes de 30 a 50 cm; (B) coleta do guaco em segmentos de aproximadamente 1 m; (C) detalhe da inflorescência da erva baleeira e (D) plantação de erva baleeira.	41
III.6	Estufa de circulação forçada utilizada para secagem das plantas.	42
III.7	Moinho de facas MMR 320 utilizado para processamento das plantas.	43
IV.1	Cromatogramas obtidos por GC-MS no modo “full scan” da solução padrão de Endrin (436 µg mL ⁻¹) recém-preparada e da solução estocada 3 meses em freezer. Condições cromatográficas: coluna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) operando a 90 °C/ 1 min (15 °C min ⁻¹) 150 °C/ 1 min (6 °C min ⁻¹) 230 °C/ 3 min (10 °C min ⁻¹) 275 °C/ 5 min; temperaturas do injetor 270 °C (“splitless”) e temperatura do detector 300 °C.	50

IV.2	Cromatogramas obtidos por GC-MS no modo “full scan” da solução padrão de 4,4’ – DDT ($468 \mu\text{g mL}^{-1}$) recém-preparada e da solução estocada 3 meses em freezer. Condições cromatográficas já descritas no texto.	51
IV.3	Cromatograma obtido por GC-MS (“full-scan”) do padrão analítico de hexaclorobenzeno ($432 \mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano) em (A) e seu espectro de fragmentação (B). Condições cromatográficas já descritas no texto.	54
IV.4	Cromatograma obtido por GC-MS (“full-scan”) do padrão analítico de lindano ($420 \mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano) em (A) e seu espectro de fragmentação (B). Condições cromatográficas já descritas no texto.	55
IV.5	Cromatograma obtido por GC-MS (“full-scan”) do padrão analítico de heptacloro ($524 \mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano) em (A) e seu espectro de fragmentação (B). Condições cromatográficas já descritas no texto.	56
IV.6	Cromatograma obtido por GC-MS (“full-scan”) do padrão analítico de aldrin ($404 \mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano) em (A) e seu espectro de fragmentação (B). Condições cromatográficas já descritas no texto.	57
IV.7	Cromatograma obtido por GC-MS (“full-scan”) do padrão analítico de heptacloro epóxido ($404 \mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano) em (A) e seu espectro de fragmentação (B). Condições cromatográficas já descritas no texto.	58
IV.8	Cromatograma obtido por GC-MS (“full-scan”) do padrão analítico de dieldrin ($428 \mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano) em (A) e seu espectro de fragmentação (B). Condições cromatográficas já descritas no texto.	59
IV.9	Cromatograma obtido por GC-MS (“full-scan”) do padrão analítico de 4,4'-DDE ($472 \mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano) em (A) e seu espectro de fragmentação (B). Condições cromatográficas já descritas no texto.	60

IV.10	Cromatograma obtido por GC-MS (“full-scan”) do padrão analítico de endrin (420 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano) em (A) e seu espectro de fragmentação (B). Condições cromatográficas já descritas no texto.	61
IV.11	Cromatograma obtido por GC-MS (“full-scan”) do padrão analítico de 4,4' - DDT (440 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano) em (A) e seu espectro de fragmentação (B). Condições cromatográficas já descritas no texto.	62
IV.12	Cromatograma total de íons obtido por GC-MS no modo SIM da mistura de padrões de OCP contendo: 5,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de hexaclorobenzeno ($t_R = 15,53$ min); 4,51 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de lindano ($t_R = 17,13$ min); 4,53 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de heptacloro ($t_R = 22,07$ min); 4,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de aldrin ($t_R = 24,62$ min); 4,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de heptacloro epóxido ($t_R = 27,97$ min); 4,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de dieldrin ($t_R = 33,08$ min); 4,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de 4,4'-DDE ($t_R = 33,58$ min); 5,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de endrin ($t_R = 34,85$ min) e 4,54 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de 4,4'-DDT ($t_R = 40,42$ min) em hexano. Condições cromatográficas: coluna HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) operando a 90 $^{\circ}\text{C}/1$ min (12 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$) 150 $^{\circ}\text{C}/1$ min (2 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$) 230 $^{\circ}\text{C}/3$ min (10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$) 275 $^{\circ}\text{C}/25$ min. Temperatura do injetor 270 $^{\circ}\text{C}$ (“splitless”) e temperatura do detetor 300 $^{\circ}\text{C}$.	63
IV.13	Curvas analíticas para os OCP: hexaclorobenzeno, lindano, heptacloro, aldrin, heptacloro epóxido e dieldrin.	66
IV.14	Curvas analíticas para os OCP: 4,4'-DDE, endrin e 4,4'-DDT.	67
V.1	Dispositivo para SPME: (1) fibra extratora; (2) agulha de aço; (3) corpo do “holder” ; (4) septo de silicone; (5) guia do “holder” e (6) êmbolo, com detalhe da extremidade fibra / agulha. Fonte: ZHANG <i>et al.</i> (1994).	77
V.2	Aparelho homogeneizador de amostras Polytron, em (A) visão geral do sistema, (B) a haste utilizada modelo PT2000 e (C) extração de amostra.	81

V.3	Foto do sistema utilizado para a microextração em fase sólida. Do lado esquerdo aparece o banho de recirculação de água (1) ligado num pequeno reator encamisado (2) e do lado direito o frasco dentro do banho do reator com a fibra inserida e sob uma placa de agitação magnética (3).	82
V.4	Foto do forno de microondas Provector utilizado para os experimentos (à esquerda) frascos de teflon (1), onde a amostra é colocada para extração, e o frasco inserido no suporte (2) para acomodação dentro do forno.	83
V.5	Cromatogramas total de íons obtidos por GC-MS (SIM) da amostra de espinheira santa proveniente do Campo Experimental de Paulínia (A) com janela expandida mostrando o pico de dieldrin (6), da espinheira santa fortificada (B) e da mistura de padrões de OCP (C). Os picos apresentados correspondem aos seguintes compostos: (1) hexaclorobenzeno; (2) lindano; (3) heptacloro; (4) aldrin; (5) heptacloro epóxido; (6) dieldrin; (7) 4,4' – DDE; (8) endrin e (9) 4,4' – DDT. Condições cromatográficas descritas no texto.	95
V.6	Cromatograma obtido por GC-MS no modo SIM da amostra de espinheira santa proveniente do Campo Experimental de Paulínia, com janela mostrando o pico de dieldrin (à direita) e a confirmação de sua identidade pelos fragmentos m/z 263, 237 e 345. Condições cromatográficas já descritas no texto.	96
V.7	Superfície de resposta obtida para o hexaclorobenzeno na otimização das condições operacionais da SPME.	99
V.8	Superfícies de resposta obtida para o lindano e heptacloro na otimização das condições operacionais da SPME.	100
V.9	Superfícies de resposta obtida para o aldrin e heptacloro epóxido na otimização das condições operacionais da SPME.	101

V.10	Superfícies de resposta obtida para o dieldrin e o 4,4'-DDE na otimização das condições operacionais da SPME.	102
V.11	Superfícies de resposta obtida para o endrin e o 4,4'-DDT na otimização das condições operacionais da SPME.	103
V.12	Comparação entre os valores (ng g ⁻¹) dos limites máximos de resíduos recomendados pela Farmacopéia Européia e os limites de quantificação para os OCP em estudo.	108
VI.1	Curvas de adição de padrão do hexaclorobenzeno e lindano em água e na infusão de guaco para visualização do efeito matriz. Análises realizadas por SPME-GC-MS utilizando a fibra de PDMS sob imersão direta na amostra durante 60 min a 50 °C e tempo e temperatura de desorção de 5 min e 270 °C. Demais condições cromatográficas já descritas no texto.	120
VI.2	Curvas de adição de padrão do heptacloro, aldrin, heptacloro epóxido e dieldrin em água e na infusão de guaco para visualização do efeito matriz. Análises realizadas por SPME-GC-MS utilizando a fibra de PDMS sob imersão direta na amostra durante 60 min a 50 °C e tempo e temperatura de desorção de 5 min e 270 °C. Demais condições cromatográficas já descritas no texto.	121
VI.3	Curvas de adição de padrão do 4,4'-DDE, endrin e 4,4'-DDT em água e na infusão de guaco para visualização do efeito matriz. Análises realizadas por SPME-GC-MS utilizando a fibra de PDMS sob imersão direta na amostra durante 60 min a 50 °C e tempo e temperatura de desorção de 5 min e 270 °C. Demais condições cromatográficas já descritas no texto.	122
A.1	Foto por satélite da região de Paulínia-SP, mostrando em (1) o Campo Experimental; (2) antigo complexo industrial Shell – Paulínia e (3) Replan.	151

APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE TESE

A organização geral deste trabalho intitulado “Pesticidas Organoclorados em Plantas Medicinais e Fitoterápicos”, está compreendida em 8 capítulos, sendo que as referências bibliográficas encontram-se dispostas no capítulo VIII para facilitar a consulta. Com relação às referências bibliográficas, estas foram apresentadas em sua forma mais completa, de acordo com a norma ABNT (NBR 6023, 2002).

Quanto ao texto propriamente dito, nos capítulos I e II foram apresentados uma revisão bibliográfica englobando os assuntos de interesse e os objetivos gerais e específicos da tese, respectivamente.

No capítulo III foi descrito o material vegetal (plantas medicinais) utilizado em todo o trabalho, apresentando um breve resumo de suas indicações terapêuticas e condições de cultivo das espécies estudadas.

O desenvolvimento e o estabelecimento das condições cromatográficas através do uso da cromatografia gasosa com detetor seletivo de massas, foram discutidos no capítulo IV.

Duas metodologias analíticas para a extração dos pesticidas organoclorados presentes nas plantas em estudo (folhas) foram testadas: uma mais convencional na análise de resíduos de pesticidas em plantas, que se baseia numa etapa de extração com solvente seguida da limpeza da amostra com o emprego da técnica de extração em fase sólida e outra metodologia alternativa que dispensa o uso de solventes orgânicos, utilizando apenas água na extração assistida por microondas e subsequente análise por SPME-GC-MS (capítulo V). Em vista dos resultados obtidos com o emprego destas diferentes técnicas, o capítulo V ainda apresenta a metodologia escolhida para a quantificação dos pesticidas organoclorados nas plantas em estudo, com a validação do método e os resultados obtidos na análise de plantas de diferentes origens de cultivo e/ou fornecedores.

A metodologia para análise de infusões através do emprego da técnica de SPME-GC-MS foi apresentada no capítulo VI, assim como o estudo da taxa de transferência dos pesticidas da folha para a infusão.

Finalizando, no capítulo VII estão as conclusões finais de todo o trabalho.

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

I.1 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS E MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

As definições de droga vegetal e medicamento fitoterápico precisam ser devidamente compreendidas para melhor utilização desses termos. Para isso, a Resolução RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, define assim droga vegetal e medicamento fitoterápico:

- *Droga vegetal – planta ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada.*
- *Medicamento fitoterápico é o medicamento obtido por processos tecnologicamente adequados, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais.*

A Organização Mundial da Saúde estima que 80% da população mundial utiliza, de algum modo, plantas medicinais como medicamentos. Das 365.000 espécies já catalogadas, 25.000 são utilizadas em preparações da medicina tradicional (GARCIA *et al.*, 2001). Estes valores indicam a importância do estudo das plantas medicinais, de modo a revelar sua eficácia, segurança e qualidade, e assegurar melhor aceitação destas pela classe médica e, conseqüentemente, pela população em geral.

A qualidade da matéria-prima vegetal é a determinante inicial da qualidade do fitoterápico, porém, não garante por si a eficácia, a segurança e a qualidade do produto final. A eficácia é assegurada através de ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos e a segurança determinada através de ensaios que comprovam a ausência de efeitos tóxicos, bem como a inexistência de contaminantes nocivos à saúde, como metais pesados, pesticidas, microrganismos e metabólitos, produtos de degradação, entre outros (FARIAS, 2001).

No Brasil, a utilização de fitoterápicos é muito freqüente, gerando cerca de 360 milhões de reais por ano, o que equivale a 2,55% do mercado brasileiro de medicamentos (PIANOWSKI, 2003). Vários fatores tiveram importância para esse crescimento do mercado de fitoterápicos, tais como a lei de reconhecimento das patentes de 1996, a lei dos genéricos em 1999 e a moda naturalista da última década, levando as indústrias farmacêuticas nacionais seguirem em busca de novas alternativas. Embora largamente utilizado, poucos desses produtos possuem estudos de eficácia comprovada no homem, os estudos de toxicidade são limitados e o controle de qualidade apropriado praticamente inexistente (SIMÕES *et al.*, 2000).

Os parâmetros de qualidade para fins farmacêuticos são, em princípio, estabelecidos nas Farmacopéias e Códigos Oficiais. Muito contrastante é a grande biodiversidade da flora brasileira ao lado do atraso de nossa Farmacopéia, no que se refere à monografias de plantas medicinais. A primeira edição da Farmacopéia Brasileira publicada em 1929 continha 257 monografias de plantas medicinais.

No final dos anos 50, juntamente com a grande expansão do mercado de medicamentos sintéticos, foi publicada a segunda edição da Farmacopéia Brasileira, onde foram excluídas cerca de 200 espécies vegetais expressivas da flora brasileira e de outros países, sob alegação de nulidade de ação terapêutica e completo desuso dessas drogas.

No período de 1980 a 1990, houve um grande aumento do consumo de plantas medicinais, em virtude do modismo naturalista existente na época e, nos anos seguintes, formaram-se várias comissões técnicas pelo Ministério da Saúde, com o objetivo de regulamentar o registro, a produção e a comercialização dos fitoterápicos, num mercado de características amplas e de baixa qualidade.

A quarta edição da Farmacopéia Brasileira foi subdividida em 6 fascículos, porém, ainda não foi completamente publicada, sendo que os fascículos 5 e 6 ainda estão sob consulta pública. A Figura I.1 apresenta o número de monografias de plantas medicinais presentes nas edições da Farmacopéia Brasileira.

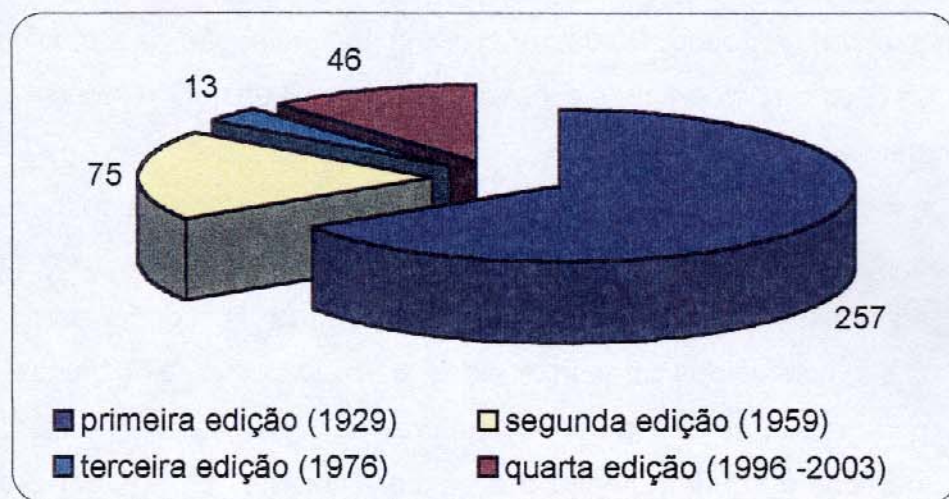


Figura I.1 Número de monografias de plantas medicinais nas edições da Farmacopéia Brasileira. Fonte: MELLO, 2003.

Na procura de certas monografias de plantas medicinais, muitas vezes torna-se necessário a consulta de outras Farmacopéias, sendo uma das mais consultadas a Farmacopéia Européia, devido ao maior número de monografias de plantas medicinais decorrente da tradição européia no uso destas drogas vegetais.

I.1.1 CONTAMINAÇÃO POR PESTICIDAS

O desenvolvimento industrial tem levado à contaminação da atmosfera, solo e água por diferentes tipos de poluentes e, conseqüentemente, transferido seus níveis de poluição para as plantas medicinais.

Os pesticidas constituem uma grande variedade de produtos químicos destinados a prevenir, destruir ou controlar pragas, diferindo entre si quanto ao modo de ação, absorção, metabolismo e toxicidade. Dependendo da finalidade para os quais são empregados, são conhecidos como inseticidas, herbicidas, fungicidas, entre outros.

O uso constante de pesticidas nas culturas agrícolas visando aumentar a produção tem causado riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Entre as diversas classes de pesticidas os organoclorados merecem destaque por apresentarem ação residual prolongada.

A contaminação de plantas por pesticidas, tanto para fins alimentares como medicinais é muito comum. Inúmeros artigos têm sido publicados na área de resíduos de pesticidas em alimentos (HU *et al.*, 1999; MIYAHARA *et al.*, 1994; MANIRAKIZA *et al.*, 2000), contrastando com a pouca informação disponível sobre resíduos em plantas medicinais (ABOU-ARAB *et al.*, 1999).

A procedência da matéria-prima vegetal é de fundamental importância no estabelecimento dos parâmetros de qualidade.

A Organização Mundial de Saúde recomenda a realização de testes para a verificação da presença e quantificação de organoclorados, principalmente no caso de matérias-primas de origem duvidosa (WHO, 1992), áreas de cultivo agrícola intensivo, e mesmo o emprego impróprio dessas substâncias em culturas de plantas medicinais ou o tratamento inadequado das drogas durante o armazenamento.

No Brasil, a legislação vigente não exige o controle da presença de pesticidas em fitoterápicos para fins de registro.

Nos últimos 40 anos os organoclorados têm sido substituídos por pesticidas mais polares e menos persistentes, representados pelos organofosforados, feniluréia, triazina e

fenoxiácidos, que são amplamente utilizados no combate de pragas diversas (LACORTE *et al.*, 2000).

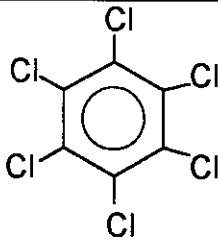
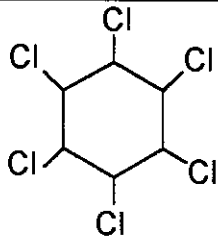
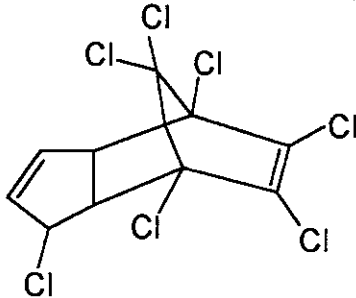
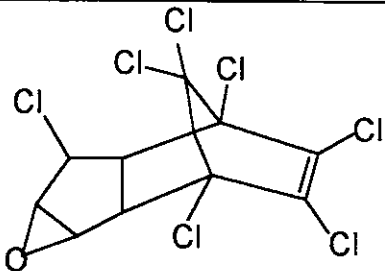
Uma vez detectada a presença de pesticidas na matéria-prima vegetal, a quantidade de compostos transferidos até o fitoterápico final depende, principalmente, do tipo e quantidade de solvente e da temperatura utilizados no processo de extração.

Para plantas medicinais contendo pesticidas, o tipo de processamento utilizado na etapa de extração do princípio ativo, poderá interferir significativamente no teor final do pesticida no produto final. No caso de extratos alcoólicos ocorre uma alta taxa de transferência de pesticidas organoclorados, o que já não ocorre com os extratos aquosos (ZUIN & VILEGAS, 2000).

I.2 PESTICIDAS ORGANOCLORADOS

Os pesticidas organoclorados (OCP) permanecem distribuídos amplamente no ambiente em níveis baixos. Suas propriedades físicas permitem que eles se acumulem em tecidos gordurosos, sendo veiculados pela cadeia alimentar, por correntes de ar e correntes oceânicas. Entre os OCP mais estudados destacam-se o DDT, DDE, lindano, aldrin, dieldrin, endrin, hexaclorobenzeno, heptacloro e heptacloro epóxido, os quais foram objetos deste estudo e cujas estruturas químicas estão apresentadas na Tabela I.1.

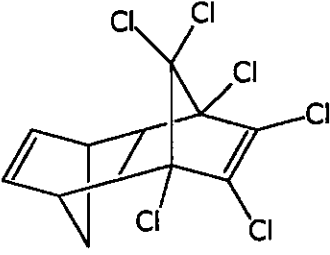
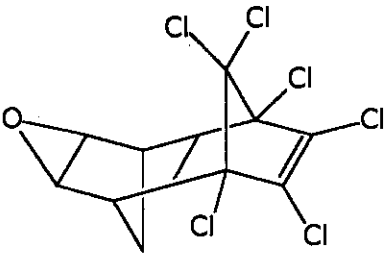
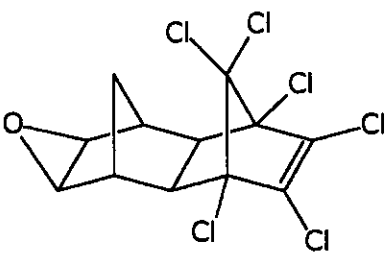
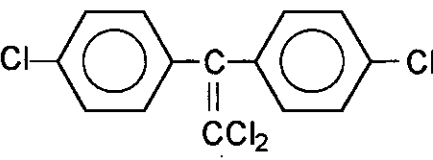
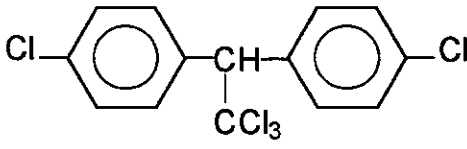
Tabela I.1 Estruturas química dos pesticidas organoclorados em estudo.

Pesticidas	Sinonímia	Estrutura Química	MM
HEXACLOROBENZENO	HCB Sanocide		285
LINDANO	Gama BHC Kwell		291
HEPTACLORO	Heptaclorano		373
HEPTACLORO EPÓXIDO	HCE		386

Legenda: MM = massa molar (g mol^{-1}).

Fonte: NIST 98.

Tabela I.1(continuação) Estruturas química dos pesticidas organoclorados em estudo.

Pesticidas	Sinonímia	Estrutura Química	MM
ALDRIN	Aldocit Tatuzinho		362
DIELDRIN	Aldrin epóxido Alvit 55 Dieldrex		381
ENDRIN	Endrex Hexadrin		381
DDE			316
DDT	Diclorodifenil tricloroetano		355

Legenda: MM = massa molar (g mol^{-1}).

Fonte: NIST 98.

O uso dos OCP e sua distribuição foram proibidos em meados da década de 80, sendo permitido somente em casos emergenciais na agricultura e saúde pública, como no caso de combate a vetores de agentes etiológicos (D'AMATO *et al.*, 2002).

O DDT foi um inseticida muito utilizado, principalmente por ser fácil de sintetizar, barato, estável e muito potente. Embora ele já tenha sido sintetizado em 1874, sua atividade inseticida só foi descoberta em 1939 e patenteado em 1942. Porém, sua popularidade foi diminuindo a medida que os insetos apresentavam resistência, além do fato de contaminar amplamente o ambiente, devido à alta estabilidade da molécula.

O produto comercial é constituído por uma mistura de isômeros: 4, 4' – DDT (77,1%); 2, 4' – DDT (14,9%); 4, 4' – DDD (0,3%); 2, 4' – DDD (0,1%) e impurezas (3,5%). Ao perder uma molécula de HCl, por degradação biológica ou ambiental, o 4,4' – DDT forma o metabólito DDE, composto ainda mais resistente às degradações que o DDT. O DDE por ser mais persistente em organismos vivos, pode servir de indicador de exposição dos seres vivos ao DDT (D'AMATO *et al.*, 2002).

O hexaclorobenzeno (HCB), usado como fungicida aplicado em sementes, é um dos poluentes mais distribuídos no globo terrestre devido à sua alta persistência no meio ambiente e alta volatilidade.

Em 1942, foi descoberto um composto chamado erroneamente BHC (do inglês “benzene hexachloride”) contendo uma alta atividade inseticida. O composto era constituído por uma mistura de isômeros produzidos pela cloração do benzeno com 6 átomos de cloro. No entanto, uma vez que o caráter aromático do anel desaparece originando o hexaclorohexano, tornou-se incorreto chamar o produto de BHC, devendo utilizar o termo HCH (do inglês “hexachlorocyclohexane”).

A molécula de HCH apresenta 2 formas de isomerismo: a do anel e a que envolve os substituintes, porém apenas 5 isômeros são encontrados no HCH: α , β , γ , δ e ϵ . Esses isômeros diferem na atividade inseticida, sendo o isômero γ , conhecido como lindano, o mais ativo e, conseqüentemente, cerca de 100 a 1.000 vezes mais tóxico que os demais isômeros.

A classe dos “drins” inclui o dieldrin, endrin e aldrin compostos altamente tóxicos e persistentes no meio ambiente. O dieldrin e o aldrin foram extensivamente usados na

Europa durante as décadas de 50 e 60, porém promoveram uma grande mortandade de pássaros quando foram aplicados em sementes na Grã-Bretanha, o que motivou uma ação regulatória na década de 60. O endrin foi usado como inseticida foliar numa grande variedade de espécies vegetais, sendo muito usado na África, Ásia, América Central e América do Sul (TURNBULL, 1996).

O aldrin é biotransformado rapidamente em dieldrin em animais e plantas. Portanto, raramente são encontrados resíduos desse pesticida em alimentos e animais. A exposição ocupacional ao aldrin, juntamente com o dieldrin e endrin, foi associada a um aumento significativo no câncer de fígado e da vesícula biliar, embora o estudo tenha apresentado algumas limitações, como a falta de informações quantitativas sobre a exposição. Além disso, um estudo realizado em mulheres na Dinamarca apontou que a exposição ao dieldrin está associada a um aumento no risco de câncer de mama e a uma maior malignidade da doença (SUASSUNA, 2003).

Em 1987, a Agência de Proteção Ambiental norte-americana (EPA, do inglês "Environmental Protection Agency") classificou o aldrin e o dieldrin como prováveis carcinógenos humanos, devido ao aumento de tumores hepáticos em camundongos submetidos à ingestão de pesticidas organoclorados (STEVENSON *et al.*, 1999).

As evidências quanto ao potencial carcinogênico na espécie humana dos pesticidas organoclorados são insuficientes, entretanto, estudos em animais indicam que estes compostos podem levar ao desenvolvimento de neoplasias no homem (NUNES & TAJARA, 1998).

Do ponto de vista epidemiológico, a avaliação do potencial carcinogênico do OCP é muito complexa, principalmente devido à grande variedade de compostos utilizados e da ausência de dados adequados sobre a natureza da exposição (BROUWER *et al.*, 1994 apud NUNES & TAJARA, 1998, p. 374).

NUNES & TAJARA (1998) citam em seu artigo, estudos que atribuem outros efeitos tóxicos dos OCP ligados à reprodução humana e sistema nervoso.

A ação dos OCP no ambiente é controlada pela sua lipossolubilidade, apreciável pressão de vapor em temperatura ambiente e alta estabilidade, o que os torna resistentes à degradação biótica ou abiótica.

A persistência relativa de cada OCP determina seu impacto ambiental no planeta, o que é determinado experimentalmente pelo seu tempo de meia-vida. O tempo de meia-vida para cada OCP varia consideravelmente de acordo com o tipo de solo, água e condições meteorológicas. A Tabela I.2. apresenta a persistência relativa de alguns OCP em diferentes compartimentos ambientais.

Tabela I.2 Tempos de meia-vida aproximados para alguns OCP.

	Endrin	Lindano	Hexaclorobenzeno	DDT
Ar	5 horas	2 dias	2 anos	2 anos
Água	3 semanas	3 semanas	6 anos	6 anos
Solo	2 meses	2 meses	6 anos	6 anos
Sedimento	8 meses	8 meses	6 anos	6 anos

Fonte: TURNBULL, 1996.

Em todos os casos a persistência ambiental aumenta quando ocorre deslocamento do ar para a água, para o solo e para o sedimento. Entretanto, este aumento da persistência é mais discreto para as moléculas mais estáveis, como o hexaclorobenzeno e DDT e mais intenso para a classe dos cicloclorodienos (aldrin, dieldrin e endrin) que são menos estáveis na atmosfera.

I.3 ANÁLISE DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS

Num levantamento feito entre 1963 e 1998 por ZUIN & VILEGAS (2000) sobre resíduos de pesticidas em plantas medicinais e fitoterápicos foi constatada a existência de um pequeno número de artigos nessa área de estudo, o que pode ser, em parte, atribuído à complexidade da matriz e ao trabalhoso procedimento analítico.

Os métodos estabelecidos para a análise de resíduos de pesticidas em alimentos nem sempre podem ser aplicados igualmente para plantas medicinais e seus produtos. Os

fitoterápicos podem conter constituintes totalmente diferentes, necessitando de um método seletivo para essa matriz.

De maneira geral, os métodos são seletivos para uma determinada classe de compostos e requerem um eficiente preparo de amostra, envolvendo etapas de extração, limpeza e pré-concentração anteriores à determinação cromatográfica (LACORTE *et al.*, 2000).

Os métodos analíticos descritos na literatura para a determinação de resíduos de pesticidas recomendam o emprego de metodologias clássicas para análise de plantas medicinais, ou seja, extração com solvente e separação em coluna cromatográfica. Esses métodos geralmente são trabalhosos, lentos, caros e utilizam um significativo volume de solventes (LINO & SILVEIRA, 1997).

1.3.1 PREPARO DE AMOSTRA

Para a extração dos pesticidas e limpeza dos extratos, diferentes técnicas têm sido empregadas, como a extração em fase sólida (SPE, do inglês "Solid Phase Extraction") (LACORTE *et al.*, 2000; LINO & SILVEIRA, 1997; MANIRAKIZA *et al.*, 2000; DI MUCCIO, 1997), microextração em fase sólida associada ao microondas (SPME – MAE, do inglês "Solid Phase Microextraction – Microwave Assisted Extraction") (WU & SWOO, 2001), extração com fluido supercrítico (SFE, do inglês "Supercritical Fluid Extraction") (CAMEL, 1998) e dispersão em fase sólida (MSPD, do inglês "Matrix Solid Phase Dispersion") (ZUIN *et al.*, 2003)

Atualmente, devido à questão ambiental gerada pelo descarte de solventes, além da dificuldade de aquisição de solventes por serem controlados pela polícia federal, tem-se dado preferência aos métodos que utilizam pouca quantidade dos mesmos. Como exemplo, a extração por fluido supercrítico, que representa um método rápido, seletivo, de fácil automação e requer baixo volume de solvente. Este método foi utilizado com sucesso por ZUIN e colaboradores (2003) na determinação de resíduos de pesticidas organoclorados

e organofosforados em folhas de plantas medicinais e posterior análise por GC/ECD/FPD (FPD, do inglês "Flame Photometric Detector"). Porém, para uma resposta satisfatória, há um grande número de parâmetros a serem otimizados (CAMEL, 1998).

A extração com fluido supercrítico apresenta vantagens em relação à extração com solventes devido à alta difusibilidade e baixa viscosidade dos fluidos supercríticos permitindo um maior contato ou permeação para dentro das matrizes vegetais e, conseqüentemente, uma maior difusão dos analitos (ZUIN *et al.*, 2003).

Um outro procedimento alternativo foi descrito por WU & SWOO (2001), que utilizaram a associação entre a extração assistida por microondas (MAE, do inglês "Microwave Assisted Extraction") e a SPME para a determinação de OCP em raízes de plantas medicinais chinesas e posterior quantificação por GC/ECD. A grande vantagem da associação da técnica de MAE com a SPME reside no fato de se utilizar somente água como solvente de extração. A água é um ótimo solvente de extração para MAE devido à sua alta constante dielétrica, facilitando a absorção do microondas; além disso, facilita a aplicação da técnica de SPME, onde o uso de solvente danificaria o revestimento da fibra.

A técnica de extração por microondas tem merecido destaque quando comparada às técnicas tradicionais de extração, devido à sua rapidez de extração e alta eficiência, com várias aplicações para pesticidas (PASTOR *et al.*, 1997), hidrocarbonetos poliaromáticos, fenóis, entre outros. O princípio da técnica consiste no aquecimento do solvente extrator, através do microondas, que entra em contato com a matriz, permitindo a migração dos compostos de interesse para fora da matriz. Ao contrário dos métodos clássicos, o aquecimento por microondas ocorre simultaneamente em toda a amostra e, dessa forma, a solução alcança seu ponto de ebulição rapidamente, reduzindo o tempo necessário para a extração (WU & SWOO, 2001).

A aplicação de microondas pode ser feita em sistemas abertos à pressão atmosférica ou em sistemas fechados que permitem o controle de pressão e temperatura.

No desenvolvimento de um método por microondas, os principais parâmetros a serem avaliados são a natureza do solvente, temperatura, potência, tempo de extração e a natureza da matriz, onde o teor de água da amostra é de grande importância devido à sua alta capacidade de absorver microondas.

Nos últimos anos surgiram muitas publicações com avanços na análise de resíduos de pesticidas, entre elas, o aparecimento da técnica de SPME, com o objetivo principal de simplificar a etapa de preparo da amostra, a qual requer procedimentos trabalhosos e demorados e demandam um grande volume de solventes. A aplicação desta técnica de extração foi realizada com sucesso na extração de OCP em diferentes tipos de matrizes, sendo que para matrizes menos complexas, como água, esta técnica associada com SPME mostrou bons resultados (LI *et al.*, 2003; ZHAO & LEE, 2001; AGUILAR *et al.*, 1999).

A primeira descrição da técnica de SPME por ARTHUR & PAWLISZYN data de 1990, e desde então teve um rápido desenvolvimento devido à sua simplicidade e vasto campo de aplicação como alternativa às metodologias tradicionais.

A técnica consiste na exposição da fibra na amostra em solução ou ao seu espaço confinante ("headspace") a fim de sorver os analitos contidos na amostra em solução na camada de recobrimento da fibra; os materiais extraídos são transferidos da fibra para um instrumento analítico adequado para a sua separação, identificação e quantificação. Frequentemente, a cromatografia gasosa é a técnica instrumental empregada para as etapas de identificação e quantificação que se seguem à extração por SPME: a fibra pode ser introduzida diretamente no injetor aquecido do cromatógrafo, sendo os analitos coletados dessorvidos termicamente e arrastados pelo fluxo de gás de arraste para a coluna cromatográfica.

O manuseio reduzido das amostras em comparação às técnicas convencionais minimiza a possibilidade de formação de artefatos. Os analitos podem ser extraídos e transferidos diretamente ao cromatógrafo a gás, sem intervenção de solventes extratores, cujo uso, além de ser uma possível fonte de contaminantes, é um fator crítico no gerenciamento de um laboratório analítico, pela necessidade de adoção de procedimentos de descarte e pelos riscos ocupacionais associados à sua manipulação.

Em 1993 a Supelco lançou no mercado o "holder" para uso em SPME juntamente com a comercialização de fibras de sílica recobertas com um filme de material sorvente (polímeros ou adsorventes sólidos) utilizadas para extração, que inicialmente eram de polidimetilsiloxano (PDMS) e poliacrilato (PA). Atualmente, encontram-se disponíveis no

comércio diferentes tipos de materiais, como Carbowax-divinilbenzeno, PDMS-divinilbenzeno e Carboxen-PDMS, e outros.

BELTRAN e colaboradores (2000) apresentaram uma revisão do uso da técnica de SPME na análise de resíduos de pesticidas em diferentes tipos de matriz, detalhando as condições de análise. Para os pesticidas organoclorados, a maioria dos autores utilizou a fibra de PDMS sob imersão direta na amostra devido às suas características apolares, informação que serviu como base para este estudo.

Dependendo da complexidade da matriz, algumas vezes a aplicação da técnica de SPME não dispensa uma etapa adicional de limpeza da amostra, porém, alguns pesquisadores têm buscado uma outra alternativa para este problema, através da fabricação de fibras mais seletivas para os analitos em questão. Esta foi a solução encontrada por CAI e colaboradores (2003) que aumentaram a seletividade da fibra para os OCP, através da produção e aplicação da fibra PPMS, uma polifenil metil siloxano.

A técnica de MSPD foi aplicada para a determinação de pesticidas organoclorados e organofosforados em amostras de *Passiflora* L. Esta técnica inclui a homogeneização da amostra, fracionamento e limpeza num simples processo, onde a amostra é triturada com um adsorvente selecionado e a mistura usada para empacotar um pequena coluna cromatográfica. A eluição se dá pela força da gravidade e a limpeza da amostra se dá pelo uso de um solvente adequado. O adsorvente utilizado foi florisil, mas um procedimento adicional de limpeza foi necessário a fim de melhorar a reprodutibilidade dos resultados. Para isso, foi utilizada uma coluna adicional de alumina neutra antes da determinação cromatográfica por GC/ECD. Os resultados obtidos mostraram-se equivalentes àqueles obtidos com o método clássico da Farmacopéia Européia, apresentando vantagens quanto à rapidez, simplicidade e custo (ZUIN *et al.*, 2003).

I.3.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

As técnicas cromatográficas instrumentais modernas constituem uma ferramenta analítica eficiente para o controle de qualidade de plantas medicinais e do produto

acabado. A cromatografia gasosa, a cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia em camada delgada são técnicas aceitas, sobretudo na Europa, na padronização de fitoterápicos. Entretanto, para a maioria absoluta das plantas medicinais brasileiras ainda é necessário o estabelecimento de metodologias analíticas adequadas (VILEGAS, 1997).

Vários tipos de detetores podem ser empregados em associação com as técnicas cromatográficas. O detetor mais utilizado para a quantificação dos OCP é o detetor de captura de elétrons (ECD) acoplado ao cromatógrafo à gás devido à sua alta seletividade e detectabilidade para essa classe de compostos (WHO, 1992). Esse detetor continua a ser utilizado para determinação dos pesticidas organoclorados, principalmente para análise de água (LI *et al.*, 2003; ZHAO & LEE, 2003; AGUILAR *et al.*, 1997), porém, quando a matriz é mais complexa um procedimento eficaz de preparo de amostra deve ser associado a fim de minimizar a presença de interferentes.

Quando a análise de resíduos de pesticida, em matrizes complexas, é realizada por GC/ECD e é constada a presença de algum analito, sua identidade deve ser confirmada. Para tanto, a cromatografia gasosa acoplada ao detetor seletivo de massas é o método recomendado, sendo utilizado por CAI *et al.* (2003), na confirmação da presença de isômeros do hexaclorociclohexano, DDT, DDE e DDD em diferentes amostras de chá. Os níveis destes compostos encontrados nas amostras de chá verde, chá tipo oo-long e chá preto variaram na faixa entre 0,11 a 11,2 ng g⁻¹.

A espectrometria de massas é o melhor modo de detecção disponível, devido à sua seletividade, detectabilidade e capacidade de identificação, sendo uma boa ferramenta para o “screening” e detecção de analitos a baixos níveis (1 ng ou menos) (MIYAHARA *et al.*, 1994; SLOBODNÍK *et al.*, 2000; AZEVEDO *et al.*, 2000). A alta seletividade desta técnica reduz a influência da matriz, dispensando o procedimento de limpeza da amostra, o qual consome tempo, dinheiro e é responsável pela diminuição da precisão do método, além de reduzir os limites de detecção.

VIDAL e colaboradores (2002) aplicaram a técnica hifenada GC-MS-MS (do inglês, “Gas Chromatography with Tandem Mass Spectrometry”) para determinação de 31 pesticidas, pertencentes a diferentes classes, entre as quais alguns organoclorados para análise de cerca de 8.000 amostras de vegetais e frutas. O procedimento analítico foi

baseado na extração dos pesticidas em diclorometano, dispensando a etapa de limpeza da amostra devido à alta seletividade do método. O mais adequado modo de ionização (impacto de elétrons ou ionização química) foi selecionado para cada pesticida numa mesma corrida cromatográfica e os resultados obtidos indicaram contaminação pelos seguintes pesticidas: metalaxil, cipermetrina, metamidofós, tebuconazol e endossulfan em matrizes como pimenta e pepino.

HO & HSIEH (2001) utilizaram a extração assistida por microondas com a SPME e posterior análise por GC/ ECD para determinação de resíduos de OCP em plantas medicinais chinesas (raízes), encontrando níveis de 10 ng g⁻¹ e 7,6 ng g⁻¹ para lindano e heptacloro, respectivamente.

HWANG & LEE (2000) determinaram resíduos de OCP em fitoterápicos comercializados em Taiwan encontrando níveis entre 2,2 a 119 ng g⁻¹ (α e β HCH, respectivamente), utilizando a SPME-GC-MS.

BARRIADA-PEREIRA e colaboradores (2003) fizeram o monitoramento de uma região da Espanha quanto à presença de OCP através da análise da vegetação local, analisando tanto folhas como raízes. Entre os vários OCP pesquisados, foi encontrado a presença de lindano e outros isômeros de hexaclorociclohexano em concentrações na faixa entre 0,06 a 12,7 ng g⁻¹.

ZUIN e colaboradores (2003) fizeram um estudo sobre os níveis de pesticidas organoclorados e organofosforados em amostras comercializadas no Brasil de *Passiflora* L. e constataram que a maioria das amostras analisadas apresentaram níveis de OCP (dieldrin, lindano, tetradifon, clorotalonil e α -endossulfan) na faixa entre 21 e 71,4 ng g⁻¹. A metodologia utilizada foi a extração com fluido supercrítico e análise por cromatografia gasosa com o detetor de captura de elétrons para detecção dos clorados e detetor fotométrico de chama para os compostos fosforados.

I.3.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A validação de métodos analíticos é realizada através de estudos laboratoriais, com o objetivo de garantir a exatidão, seletividade, reprodutibilidade e robustez de um método dentro de uma faixa específica na qual o analito será analisado.

Os principais parâmetros avaliados são: exatidão, precisão, seletividade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), sensibilidade, linearidade e faixa linear.

I.3.3.1 EXATIDÃO

A exatidão mede o quanto o valor obtido na análise está próximo do valor verdadeiro presente da amostra, e pode ser determinada através da análise de materiais certificados, fazendo-se a comparação entre dois métodos, sendo um deles, o método oficial ou de referência, ou então, através de testes de recuperação, onde quantidades conhecidas do analito são adicionadas à matriz amostra (processo conhecido como fortificação). A porcentagem de recuperação é definida como a relação entre a concentração determinada para uma amostra fortificada e a concentração adicionada na fortificação, expressa através da equação:

$$\% \text{ recuperação} = \frac{\text{concentração encontrada na amostra fortificada } (\mu\text{g g}^{-1})}{\text{concentração adicionada na amostra } (\mu\text{g g}^{-1})} \times 100$$

Para análise de resíduos de pesticidas, recuperações no intervalo de 60 a 120 % são aceitáveis.

I.3.3.2 PRECISÃO

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados analíticos quando uma mesma amostra é analisada repetidas vezes em condições idênticas de análise. O resultado é dado em forma da estimativa do desvio padrão (RSD) ou coeficiente de variação (CV) quando um número significativo de repetições é realizado.

$$RSD = \frac{\text{estimativa do desvio padrão}}{\text{média das replicatas}} \times 100$$

O valor aceitável da precisão irá variar em função da concentração do analito na matriz, de acordo com a equação de Horwitz:

$$RSD = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$$

onde,

C = concentração do analito expressa por unidade de massa.

RSD = estimativa do desvio padrão.

Portanto, para níveis de concentração na faixa de 1000 ng g⁻¹, o esperado é de uma variação máxima de 16% (EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/EC, 2002).

I.3.3.3 Seletividade

O ICH (do inglês "International Conference on Harmonization") define seletividade como a habilidade do método em acessar inequivocamente o analito na presença de compostos que possam estar presentes, como impurezas, produtos de degradação ou componentes da matriz (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2002).

Quando um procedimento cromatográfico é utilizado, deve-se apresentar cromatogramas representativos a fim de demonstrar o grau de seletividade. Testes de pureza do pico (quando do uso do detetor de arranjo de diodos ou do detetor seletivo de massas) podem ser úteis para mostrar que o pico cromatográfico do analito não é atribuído a mais de um composto.

I.3.3.4 Limite de Detecção

Limite de detecção é a menor concentração do analito que pode ser detectada no cromatograma, mas não quantificada, com um certo nível de confiança, utilizando um determinado método analítico.

Para determinações de resíduos, a forma mais empregada para cálculo do limite de detecção é através da relação 3 vezes sinal/ruído, sendo o resultado expresso como a concentração do analito na amostra.

I.3.3.5 Limite de Quantificação

O limite de quantificação de um método representa a menor quantidade do analito presente numa amostra que pode ser determinado com aceitáveis precisão e exatidão sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é uma característica de ensaios quantitativos, onde espera-se baixos níveis de concentração do analito. Seu valor, expresso como concentração do analito na amostra, é estimado pela razão 10 vezes sinal/ruído. Esse valor deve ser confirmado experimentalmente.

I.3.3.6 Sensibilidade

A sensibilidade é um parâmetro que descreve como a resposta do detetor varia em função da concentração do analito. Pode ser expressa pelo coeficiente angular da reta obtida a partir da regressão linear da curva analítica.

I.3.3.7 Linearidade

A linearidade é determinada pela habilidade do método em fornecer resultados que são diretamente proporcionais as concentrações do analito dentro da faixa linear da curva analítica. O coeficiente de correlação é utilizado para avaliar a linearidade da curva analítica e deve ser maior do que 0,98.

I.3.3.8 Faixa linear

A faixa linear é definida como a faixa de concentração onde a sensibilidade do método, pode ser mantida constante.

I.3.4 LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO (LMR)

Os níveis de resíduos de pesticidas são controlados pelo MRL (limite máximo de resíduo) e seus valores estabelecidos por cada país. Entende-se por MRL a concentração máxima de resíduo de pesticida resultante de seu uso conforme a boa prática agrícola. O MRL é estabelecido pela Comissão do Codex Alimentarius para ser legalmente aplicável para o alimento, produto agrícola ou ração animal. A concentração é expressa em miligramas do resíduo do pesticida por quilograma do produto.

O Comitê Conjunto FAO/WHO de peritos sobre resíduos de pesticidas (JMPR) tem se reunido anualmente desde 1966, onde os peritos da OMS têm como responsabilidade efetuar a avaliação toxicológica e o estabelecimento da ingestão diária aceitável (IDA) para os pesticidas e os peritos da FAO responsáveis pelas recomendações dos MRL, assim como pelos métodos de análise dos pesticidas. Em adição a estas funções, o Comitê Conjunto também atua como órgão de consulta para o Comissão do Codex Alimentarius, especialmente para o Comitê sobre Resíduo de Pesticidas (CCPR).

O estabelecimento dos limites toleráveis de pesticidas em plantas medicinais está diretamente relacionado às regulamentações para alimentos, fato que tem sido questionado por alguns pesquisadores, uma vez que muitas destas preparações medicinais de origem vegetal são empregadas por períodos prolongados, além do que, dependendo do tipo de processamento da planta para o consumo pode haver concentração ou diluição destes contaminantes. Dessa forma, recomenda-se o estabelecimento de limites específicos para plantas medicinais.

Lamentavelmente, a Farmacopéia Brasileira não define os LMR e nem recomenda método analítico para determinação de pesticidas, o que não significa que a presença destes contaminantes deva ser tolerada (ZUIN & VILEGAS, 2000). Já a Farmacopéia Européia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2001) e a Farmacopéia Americana (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2002) estabelecem limites para uma série de pesticidas, bem como o método de análise.

A Tabela I.3 apresenta os valores de LMR expressos em ng g^{-1} para os OCP.

Tabela I.3 Limites máximos de resíduos de pesticidas organoclorados expressos na Farmacopéia Européia .

Pesticidas Organoclorados	Limites máximos (ng g ⁻¹)
Hexaclorobenzeno	100
Lindano	600
Heptacloro + heptacloro epóxido	50
Aldrin + dieldrin	50
Endrin	50
DDT (4,4'-DDT + 2,4'-DDT + 4,4'-DDE + 4,4'-DDD)	1000

Fonte: EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2001.

Os valores de LMR dos compostos que sofrem metabolização ou degradação são referentes à soma entre o pesticida e o composto formado, como exemplo o aldrin e dieldrin, o heptacloro e o heptacloro epóxido. No caso do DDT, o valor de 1000 ng g⁻¹ refere-se à soma dos compostos 4,4'-DDT; 2,4'-DDT; 4,4'-DDE e 4,4'-DDD (Tabela I.3).

CAPÍTULO II - OBJETIVOS

II.1 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais deste trabalho visam o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de pesticidas organoclorados em diferentes tipos de matrizes: plantas medicinais, mais precisamente nas folhas e na sua forma mais comum de utilização, a infusão, bem como avaliar a presença destes contaminantes em espécies perenes cultivadas no Campo Experimental de Paulínia-SP.

II.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos compreendem:

- Desenvolver e validar métodos cromatográficos, empregando a cromatografia gasosa com o detector seletivo de massas (GC-MS) para a determinação de pesticidas organoclorados em plantas medicinais e infusões.
- Avaliar diferentes técnicas de preparo de amostra como: microextração em fase sólida (SPME), extração assistida por microondas associada a microextração em fase sólida (MAE-SPME) e extração em fase sólida (SPE) e aplicar a metodologia validada para a determinação de OCP em algumas amostras disponíveis no comércio.
- Avaliar a presença dos OCP no Campo Experimental de Paulínia, através da análise de algumas espécies perenes cultivadas como guaco, espinheira-santa e erva baleeira.
- Estudar a taxa de transferência dos pesticidas contidos na matriz para o chá, que é a forma mais utilizada popularmente.

CAPÍTULO III – MATRIZES VEGETAIS.

III.1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais selecionadas para este estudo foram: *Mikania laevigata* Schultz Bip, *Maytenus ilicifolia* e *Cordia curassavica* (Jacq) Roem, conhecidas popularmente como guaco, espinheira santa e erva baleeira, respectivamente.

O uso do guaco como planta medicinal é muito antigo. Em 1870, foi criado um preparado a base de folhas e hastes, denominado Opodeldo de Guaco, considerado bastante eficaz no tratamento da bronquite, tosse e reumatismo.

Para o gênero *Mikania* são citadas cerca de 415 espécies, distribuídas principalmente na América Central e do Sul, sendo 171 espécies no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Sudeste (DI STASI, 1995; GOTTLIEB & KAPLAN, 1993). Essa planta possui propriedades medicinais comprovadas, sendo muito conhecida por seus efeitos broncodilatador e expectorante. As folhas das espécies deste gênero são utilizadas pela medicina popular como antiasmáticas, cicatrizantes, anti-reumáticas, antiulcerogênica e antiofídicas (PIO CORRÊA, 1942; RUPPELT *et al.*, 1991; GUPTA, 1994; PEREIRA *et al.*, 1994).

No Campo Experimental de Paulínia, a espécie selecionada para o estudo foi a *Mikania laevigata* Schultz Bip (Figura III.1).



Figura III.1 Foto das folhas de *Mikania laevigata*, conhecida popularmente como guaco.

Conhecida popularmente por espinheira santa, *Maytenus ilicifolia* é uma planta de porte arbóreo arbustivo pertencente a família Celastraceae, nativa do Brasil, e utilizada na forma de chá ou cápsulas de folhas moídas no tratamento de úlceras gástricas (MAGALHÃES, 1997).

É uma planta de difícil propagação, que tem preferência por locais sombreados, solos humosos, no entanto, desenvolvem-se bem em luz plena. A colheita é feita após o segundo ano, somente uma vez por ano (MAGALHÃES, 1997).

Na medicina tradicional é usada no tratamento de úlceras, indigestão, gastrites crônicas e dispepsia. Sua potente atividade anti-ulcerogênica foi demonstrada num estudo farmacológico de 1991, confirmando que um simples extrato de água quente de suas folhas foi tão eficaz quanto dois dos principais fármacos usados para este tratamento: ranitidina e cimetidina (LORENZI & MATOS, 2002).

A Figura III.2 apresenta a foto da espinheira santa cultivada no Campo Experimental de Paulínia.



Figura III.2 Foto das folhas de *Maytenus ilicifolia*, conhecida popularmente como espinheira santa.

A *Cordia curassavica*, conhecida por erva baleeira (Figura III.3), é uma planta arbórea-arbustiva pertencente a família Boraginaceae, comumente encontrada no litoral paulista, muito utilizada na forma de chá e em preparações tópicas devido a sua atividade antiinflamatória (MAGALHÃES, 1997).

É uma planta cultivada em todo o país, tolerante a terrenos arenosos e úmidos, florescendo nos meses de verão. Prefere climas quentes, principalmente os da zona litorânea (MAGALHÃES, 1997).

É amplamente utilizada na medicina popular como anti-inflamatória, anti-artrítica, analgésica, tônica e anti-ulcerogênica. O chá de suas folhas é utilizado para reumatismo, gota, dores musculares, nevralgias e contusões, sendo também recomendado para uso externo em feridas e ulcerações. Estudos farmacológicos em ratos já tem validado várias propriedades atribuídas a esta planta pela medicina tradicional (LORENZI & MATOS, 2002).



Figura III.3 *Cordia curassavica* (erva baleeira) com inflorescência.

Os critérios de escolha destas plantas foram o amplo uso popular, principalmente na forma de infusão e também por se tratarem de espécies perenes, que sofrem acúmulo de poluentes, a fim de avaliar a contaminação ambiental da região através da análise das plantas cultivadas no Campo Experimental de Paulínia, pertencente ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA-UNICAMP).

O Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA-UNICAMP, localizado em Paulínia – SP, vêm desenvolvendo nos últimos anos, pesquisas com diversas plantas medicinais de interesse, visando à obtenção de produtos eficazes que possam ser utilizados no tratamento de diversas doenças. Dentre as inúmeras plantas cultivadas no CPQBA, foram selecionadas para este estudo: *Mikania laevigata* Schultz Bip, conhecida como "guaco" ou "guaco cheiroso", *Maytenus ilicifolia* ou espinheira santa e *Cordia curassavica* (Jacq) Roem conhecida popularmente como erva baleeira. As folhas destas três plantas são amplamente utilizadas na medicina popular na forma de infuso ou decoto e disponíveis comercialmente em farmácias.

Cabe ressaltar, que o Campo Experimental do CPQBA produz algumas espécies de plantas medicinais para indústrias farmacêuticas com a finalidade de serem utilizadas na elaboração de medicamentos fitoterápicos, além do uso em experimentos agrônômicos, visando aclimação e melhoramento genético de espécies de interesse.

O interesse no estudo da contaminação das plantas cultivadas nesse local, reside no fato da cidade de Paulínia ser considerada um dos maiores centros petroquímicos do país, com 107 indústrias, das quais 42 são do setor químico, responsáveis pelo lançamento no ambiente de resíduos contendo organoclorados, metais pesados e gases tóxicos, assim como pela contaminação da água, solo e ar, segundo dados publicados no jornal Folha de São Paulo de 26/06/01.

A CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) tem emitido, nos últimos anos, vários relatórios a respeito da poluição ambiental de Paulínia, relatando, entre outros, sobre a contaminação de mata ciliar por micronutrientes e metais pesados, como chumbo e cádmio (POMPÉIA *et al.*, 1993), danos causados a vegetação pela emissão de fluoretos gasosos (AGUIAR *et al.*, 1992) e degradação da qualidade do ar devido a elevada concentração de partículas inaláveis e ozônio (LACAVA *et al.*, 1999).

Entre os casos de maior repercussão devido à sua gravidade, destaca-se o da empresa Shell que contaminou o solo e lençol freático do rio Atibaia, bem como moradores da região, com pesticidas organoclorados produzidos no antigo Centro Industrial Shell-Paulínia.

O complexo industrial Shell – Paulínia foi instalado numa área com cerca de 40 hectares, ocupando uma região bem próxima ao rio Atibaia, um dos principais afluentes

do rio Piracicaba, responsável pelo abastecimento de várias cidades da região. Na faixa intermediária entre a localização da indústria e o rio, existe uma região de chácaras, onde está localizado o bairro Recanto dos Pássaros (Figura III.4).



Figura III.4 Foto aérea do complexo industrial Shell- Paulínia, mostrando em (1) o rio Atibaia, (2) região de chácaras do bairro Recanto dos Pássaros e (3) o complexo industrial.

O cronograma da contaminação da região do bairro Recanto dos Pássaros pelos pesticidas organoclorados produzidos no complexo Industrial Shell – Paulínia está resumido na Tabela III.1.

Tabela III.1 Resumo do caso Shell-Paulínia.

Data	Acontecimento
1975	A Shell, multinacional holandesa do ramo químico, inicia a construção da planta industrial em Paulínia – SP para fabricação de pesticidas.
1977	Tem início a produção de aldrin e endrin e o processamento de dieldrin.
1994	Shell negocia a venda de suas fábricas de pesticidas para a American Cyanamid Co, sendo que os negócios incluíram uma auditoria ambiental, na qual ficou constatada a contaminação das águas subterrâneas. Com base nesses resultados, a Shell protocolou uma auto-denúncia junto ao Ministério Público.
1995	A empresa assina um Termo de Ajustamento de Conduta junto ao Ministério Público, onde compromete-se a realizar trabalhos de remediação.
1996	A empresa coleta amostras de água e solo e envia para análise num laboratório americano (Lancaster), o qual constata a contaminação por drins. O laboratório solicita novas amostras para confirmação dos resultados, mas a Shell não enviou as amostras.
2000	O caso é revelado ao público pela mídia. Novas análises foram realizadas por 3 diferentes laboratórios (Cetesb, Ceimic e Instituto Adolfo Lutz). Os resultados confirmaram a contaminação.
Fev/2001	Shell torna público o resultado das análises e reconhece a contaminação por “drins”.
ago/2001	A Prefeitura de Paulínia divulga os resultados preliminares dos 181 exames de sangue feitos em moradores da região e funcionários da fábrica, apontando contaminação crônica com pesticidas e/ou metais pesados em 156 pessoas. Dessa população analisada 53% possuem contaminação crônica e 30,5% de 59 exames apresentam tumores hepáticos e da tireóide.

Fonte: Jornal Correio Popular de 24 de agosto de 2001.

Foi relatado que os índices de contaminação por dieldrin atingiram níveis de 17 ng g⁻¹ no solo e 0,47 ng g⁻¹ na água. Esses valores ultrapassam os limites internacionalmente aceitos, sendo que o limite máximo de dieldrin permitido para a água, segundo a legislação brasileira (Portaria 1469/2000–Ministério da Saúde), é de 0,03 ng g⁻¹ (SUASSUNA, 2003).

III.2 EXPERIMENTAL

III.2.1 MATERIAL VEGETAL

Os exemplares das exsicatas das plantas medicinais provenientes do Campo Experimental de Paulínia (*Mikania laevigata* Schultz Bip, *Cordia curassavica* (Jacq) Roem e *Maytenus ilicifolia*) estão depositados no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob números UEC - 102.046, UEC – 112.744 e UEC 112.745, respectivamente.

Também foram adquiridas amostras de guaco junto ao comércio, sendo uma amostra proveniente de uma distribuidora de plantas medicinais em São Paulo e outra obtida em uma farmácia de manipulação em Jundiaí – SP. Quanto à verdadeira identidade botânica das amostras comerciais de guaco, fica mais conveniente apenas usar o termo guaco, uma vez, que já vieram secas e parcialmente trituradas.

Segundo a distribuidora de plantas medicinais de São Paulo, a amostra de guaco fornecida foi cultivada no Paraná, e o guaco da Farmácia de Manipulação, segundo laudo apresentado pela farmácia, originário da região sul do país, porém estes dados são apenas ilustrativos.

III.2.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados para secagem e moagem das folhas foram: uma estufa de circulação forçada da marca Blue M (Blue Island, IL, EUA) e um moinho de facas MMR 320, da MR Manesco & Ranieri (Piracicaba, SP, Brasil), respectivamente.

III.2.3 COLETA E SECAGEM DAS PLANTAS CULTIVADAS EM PAULÍNIA

A coleta das 3 espécies (*Mikania laevigata*, *Cordia curassavica* e *Maytenus ilicifolia*) cultivadas no Campo Experimental de Paulínia foi realizada no dia 14 de janeiro de 2002 (das 15:15 às 16:20 h) sob orientação e supervisão do Dr. Pedro Melillo de Magalhães. A Tabela III.2. apresenta maiores detalhes sobre o procedimento de coleta, amostragem e secagem das plantas.

Tabela III.2 Coleta e secagem das plantas.

Plantas		Estágio de desenvolvimento da planta	Número de plantas por amostragem	Secagem e rendimento (Y) da planta seca
Nome científico	Nome popular			
<i>Maytenus ilicifolia</i>	Espinheira santa	Plantas colhidas sem o fruto na forma de hastes com 30 a 50 cm de comprimento.	22 plantas	40 °C/48 h Y = 350 g
<i>Cordia curassavica</i>	Erva baleeira	Plantas colhidas com inflorescências, porém estas foram removidas manualmente antes da secagem.	18 plantas	40 °C/48 h Y = 350 g
<i>Mikania laevigata</i>	Guaco	Planta no estado vegetativo sem inflorescências. Foram coletados segmentos de cerca de 1 m para a secagem e posterior remoção do caule maior.	20 plantas	40 °C/72 h Y = 500 g

A Figura III.5 apresenta algumas fotos da coleta destas plantas no Campo Experimental de Paulínia.



Figura III.5 Fotos das plantas cultivadas em Paulínia-SP: **(A)** coleta da espinheira santa em hastes de 30 a 50 cm; **(B)** coleta do guaco em segmentos de aproximadamente 1 m; **(C)** detalhe da inflorescência da erva baleeira e **(D)** plantação de erva baleeira.

No mesmo dia da coleta, as plantas foram colocadas em bandejas e levadas para secagem em estufa com circulação forçada na temperatura de 40 °C durante 48 h para a

Cordia curassavica e o *Maytenus ilicifolia*. Para a amostra de *Mikania laevigata* foi necessário um tempo maior de secagem, aproximadamente 72 h (Figura III.6).



Figura III.6 Estufa de circulação forçada utilizada para secagem das plantas.

Após a secagem das plantas, os talos foram manualmente retirados, as folhas foram trituradas em moinho de facas na presença de gelo seco, a fim de preservar a composição da amostra, e embaladas em sacos duplos de papel e plástico para armazenamento em freezer ($- 18^{\circ}\text{C}$) até o momento da análise. Na Figura III.7 está apresentada a foto do moinho de facas utilizado no processamento das amostras.

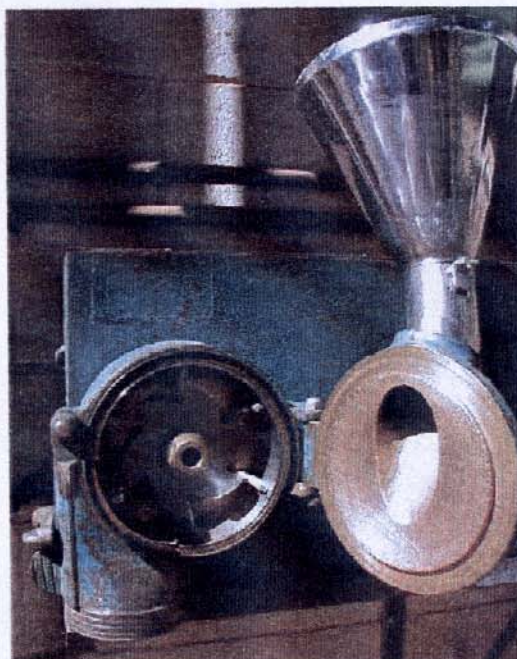


Figura III.7 Moinho de facas MMR 320 utilizado para processamento das plantas.

Esse processamento do material vegetal garantiu a homogeneidade das amostras e a preservação de seus constituintes. Essas plantas foram utilizadas como matriz para o desenvolvimento de método analítico para dosagem de OCP nas folhas, também como matéria-prima para a produção de infusos e para quantificação dos pesticidas.

CAPÍTULO IV – ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA DETERMINAÇÃO DOS PESTICIDAS ORGANOCLORADOS POR GC-MS.

IV.1 INTRODUÇÃO

A análise de resíduos de pesticidas normalmente requer o emprego de métodos de separação e a utilização de detetores seletivos com alta detectabilidade. Para a determinação de pesticidas organoclorados, a cromatografia gasosa com detetor de captura de elétrons (ECD) ou detetor seletivo de massas (MS) têm sido amplamente empregados. Embora o detetor de captura de elétrons seja o mais comumente empregado, devido à sua alta detectabilidade para compostos clorados, ele não é um detetor confirmatório, sendo necessária uma análise complementar por GC-MS. Além disso, o uso do ECD requer cuidados especiais nos procedimentos de limpeza da amostra para evitar interferentes na análise cromatográfica.

Já o detetor seletivo de massas pode ser utilizado tanto para fins quantitativos como para fins confirmatórios, sendo, portanto, o detetor escolhido para as análises de resíduos dos OCP neste trabalho.

Devido ao caráter lipofílico dos pesticidas organoclorados, a maioria dos trabalhos presentes na literatura utilizam colunas cromatográficas de baixa polaridade para separação destes compostos. A metodologia proposta pela WHO (1992) recomenda o uso da coluna 5% fenil/95% metilpolisiloxano ou a coluna contendo 7% cianopropil/7% fenil/86% metil polisiloxano. Dentre os artigos consultados, a coluna cromatográfica mais utilizada para separação dos OCP, foi a coluna contendo como fase estacionária 5% fenil/95% metilpolisiloxano (BARRIADA-PEREIRA *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2003; ZUIN *et al.*, 2003; MANIRAKIZA *et al.*, 2000; LINO & SILVEIRA, 1997). Porém, outras colunas como a 100% dimetilpolisiloxano (AGUILAR *et al.*, 1997), a 14% cianopropilfenil metilpolisiloxano (DI MUCCIO *et al.*, 1997) e uma coluna específica para determinação de OCP denominada DB-608 produzida pela J & W Scientific (Folsom, CA, EUA) utilizada por HO & HSIEH (2001) também foram utilizadas com sucesso.

IV.2 OBJETIVOS

Em vista destes fatores, este capítulo tem como objetivo otimizar a separação cromatográfica dos 9 pesticidas organoclorados (hexaclorobenzeno, lindano, heptacloro, heptacloro epóxido, aldrin, dieldrin, endrin, 4,4'-DDE e 4,4'-DDT), através da cromatografia gasosa acoplada ao detetor seletivo de massas operando no modo SIM utilizado para quantificação.

IV.3 EXPERIMENTAL

IV.3.1 INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As análises por GC-MS foram realizadas em um instrumento HP 5890 serie II acoplado ao detetor seletivo de massas HP 5971 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, EUA) e injetor automático HP 7673. A coluna capilar utilizada foi HP-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m) J & W Scientific (Agilent, Folsom, CA, EUA). As injeções foram realizadas automaticamente (1 μ L) no modo "splitless" com a válvula aberta após 1,5 min e com o injetor operando a 270 °C. A vazão do gás de arraste (hélio) foi de 1 mL min⁻¹.

Várias programações de temperatura foram testadas e a mais satisfatória para a separação dos 9 pesticidas em estudo está apresentada como resultado no item IV.4.1.

Para a quantificação dos pesticidas, o detetor seletivo de massas foi utilizado no modo SIM, atribuindo a cada pesticida o fragmento mais abundante para ser usado como íon de quantificação (IQ) e outros dois íons para identificação (II), considerando o tempo de eluição de cada analito. Os tempos de retenção e as abundâncias relativas de IQ e II foram utilizados como critério de confirmação.

IV.3.2 PADRÕES ANALÍTICOS

A escolha dos padrões de OCP utilizados neste trabalho foi baseada em indicações da literatura e disponibilidade dos mesmos. Os padrões analíticos adquiridos junto à Chem Service (West Chester, PA, EUA) foram: hexaclorobenzeno 99 %, lindano 98,9 %, heptacloro 99,5%, heptacloro epóxido (isômero B) 99,5 %, aldrin 98,5 %, dieldrin 98,9 %, endrin 99,0 %, 4,4'-DDE 99,3 % e 4,4'-DDT 98,8 % de pureza.

IV.3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO

As soluções estoque de cada pesticida foram preparadas na concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano grau resíduo (Tedia, Fairfield, OH, EUA). Uma alíquota de 1 mL de cada solução estoque dos pesticidas foi diluída em um mesmo balão volumétrico de 25 mL com hexano, correspondendo à concentração de 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada composto (solução I). Tanto a solução I como as soluções estoque foram devidamente armazenadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua utilização.

Para checar a integridade dos padrões em solução, antes de sua utilização eram feitas injeções no GC-MS e o cromatograma obtido comparado àquele obtido imediatamente após o preparo da mistura. Diante do aparecimento de picos de decomposição no cromatograma obtido, a solução era descartada e uma nova solução padrão preparada.

As soluções padrão de 4,4' – DDT e de endrin foram as que demonstraram problema de estabilidade após 3 meses de armazenamento no freezer ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$), conforme apresentado nas Figura IV.1-2.

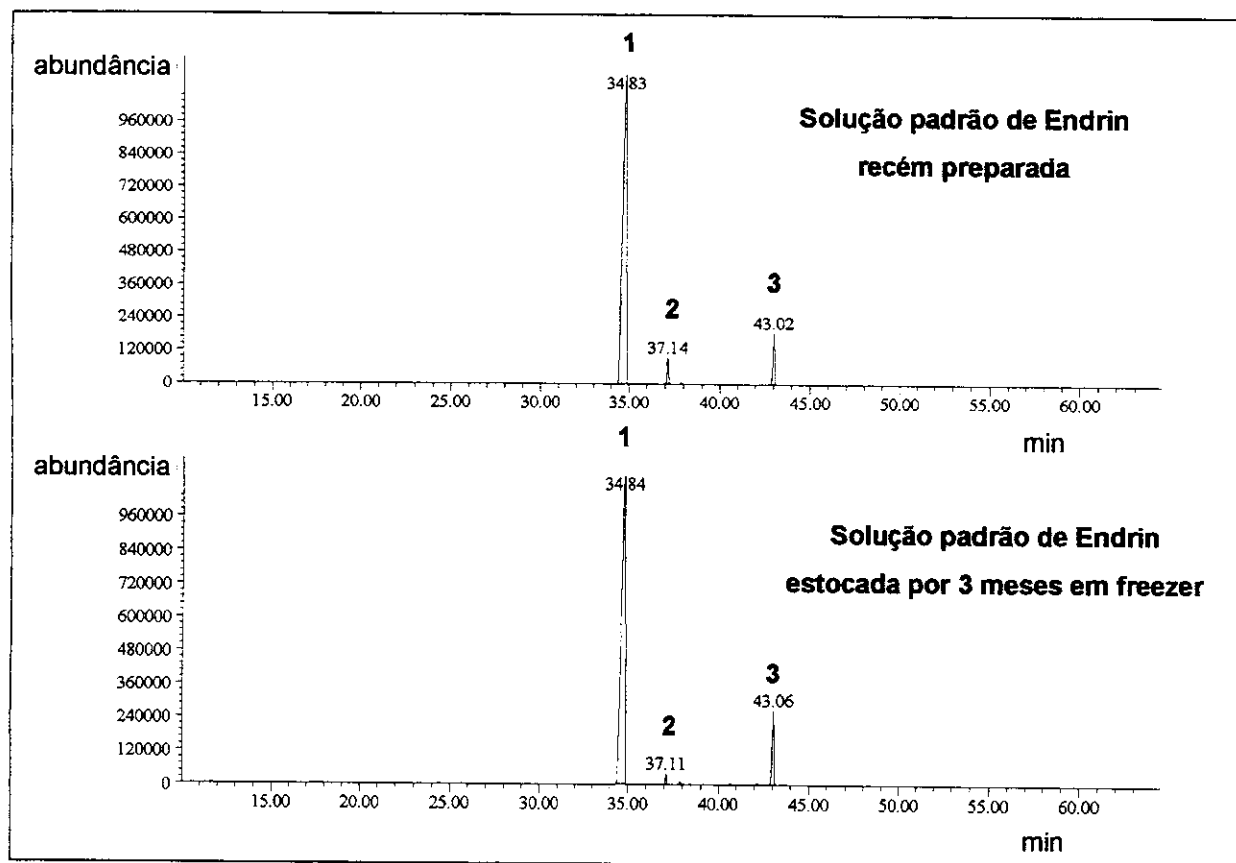


Figura IV.1 Cromatogramas obtidos por GC-MS no modo "full scan" da solução padrão de Endrin ($436 \mu\text{g mL}^{-1}$) recém-preparada e da solução estocada 3 meses em freezer. Condições cromatográficas: coluna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) operando a $90^\circ\text{C}/1 \text{ min}$ ($15^\circ\text{C min}^{-1}$) $150^\circ\text{C}/1 \text{ min}$ (6°C min^{-1}) $230^\circ\text{C}/3 \text{ min}$ ($10^\circ\text{C min}^{-1}$) $275^\circ\text{C}/5 \text{ min}$; temperaturas do injetor 270°C ("splitless") e temperatura do detetor 300°C .

Os cromatogramas obtidos por GC-MS com a solução padrão de endrin (Figura IV.1) mostram uma pequena alteração nos picos de impurezas 2 e 3, quando comparadas a solução recém preparada com a estocada por 3 meses em freezer. A integração por área destes cromatogramas mostra não haver alteração com o pico de endrin (pico 1) e sim com as proporções das impurezas (picos 2 e 3), porém, como maneira de prevenção esta solução era refeita a cada 2 meses.

A Figura IV.2 mostra os cromatogramas obtidos com a solução padrão de 4,4'-DDT, sendo que para os demais pesticidas em estudo não houve alteração nos cromatogramas obtidos com as soluções estocadas até um período de 3 meses.

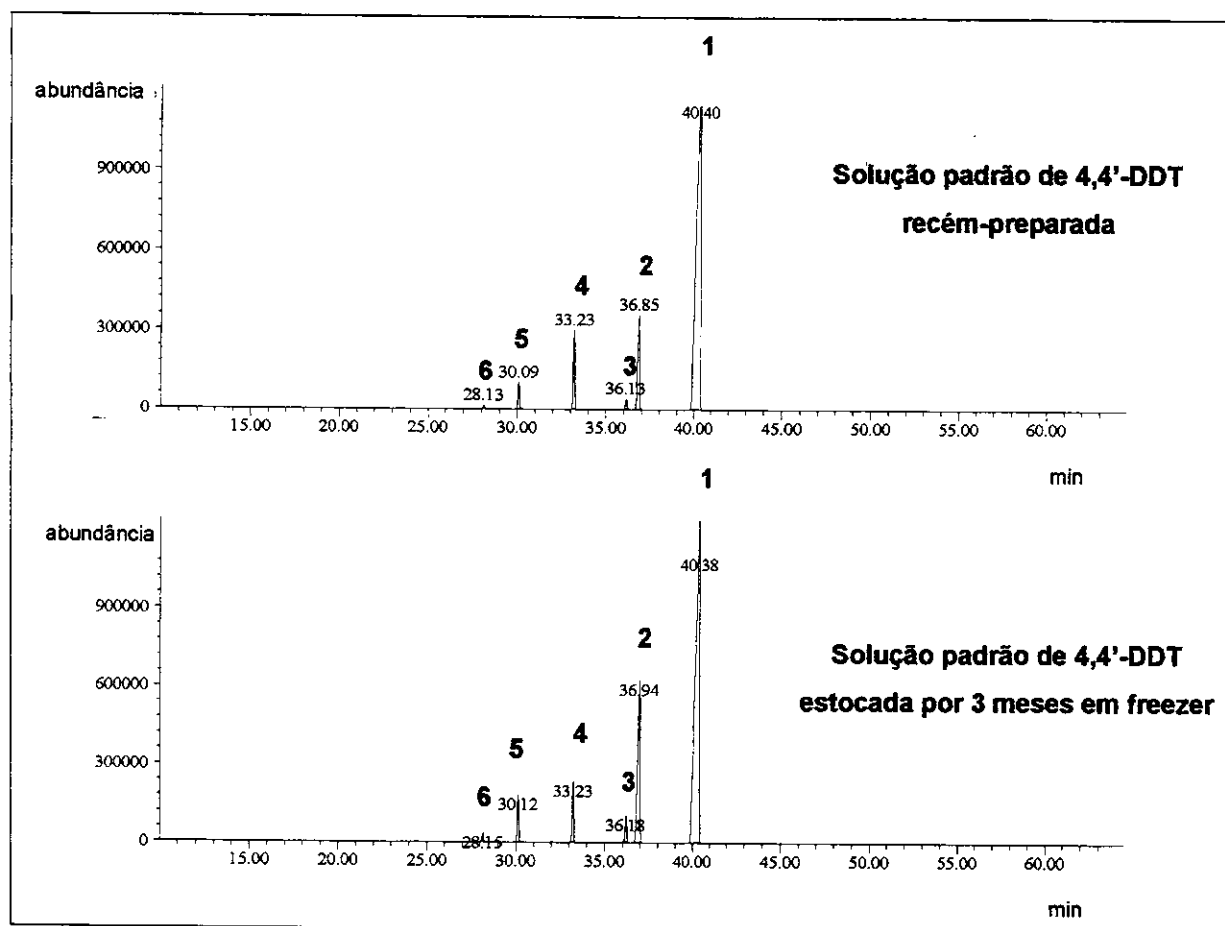


Figura IV.2 Cromatogramas obtidos por GC-MS no modo "full scan" da solução padrão de 4,4' – DDT ($468 \mu\text{g mL}^{-1}$) recém-preparada e da solução estocada 3 meses em freezer. Condições cromatográficas as mesmas da Figura IV.1.

Conforme apresentado na Figura IV.2, o cromatograma da solução padrão de 4,4'-DDT recém-preparada em hexano e injetada no GC-MS apresentou picos de impurezas do próprio padrão analítico de 98,8% de pureza. A integração em área deste cromatograma obtido no modo "full-scan" apresentou 80% em área para o pico majoritário de 4,4'-DDT (pico 1) ao passo que, quando estocada, mesmo sob baixa temperatura durante um período de 3 meses, esta porcentagem de área cai para 70%, indicando a não estabilidade da solução. Em vista deste resultado, toda vez que uma nova diluição dos padrões analíticos era feita, a solução estoque de 4,4'-DDT era re-analisada para conferir a proporção dos picos do padrão (Tabela IV.1) e utilizada dentro de um período máximo de 2 meses.

Tabela IV.1 Proporções das impurezas obtidas por porcentagem em área (GC-MS) da solução padrão de 4,4'-DDT.

Picos	Solução padrão de 4,4'-DDT (% em área)	
	Recém preparada	Estocada a -18 °C por 3 meses
1	80	70
2	9,7	19
3	0,85	2,2
4	6,7	4,9
5	2,0	3,3
6	0,25	0,51

IV.3.4 CURVAS ANALÍTICAS

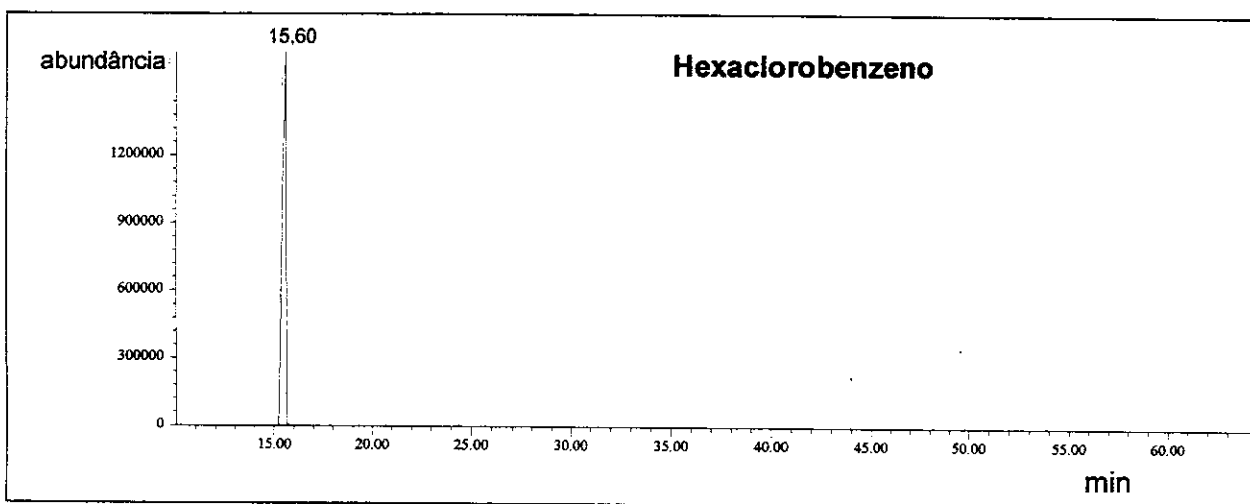
Foram construídas curvas analíticas contendo a mistura dos 9 pesticidas organoclorados e verificados os seguintes parâmetros: faixa linear, sensibilidade, linearidade, detectabilidade e precisão.

IV.4 RESULTADOS

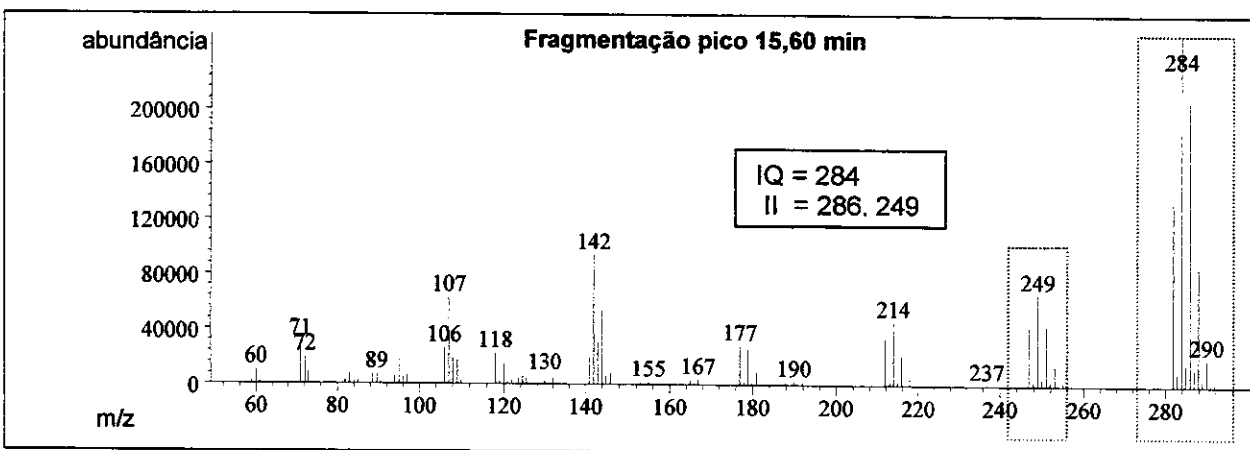
IV.4.1 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS NO GC-MS

O primeiro passo para o estabelecimento das condições cromatográficas foi a injeção cromatográfica de cada padrão analítico no GC-MS operando no modo "full scan". Os cromatogramas obtidos forneceram o espectro de massas individual dos pesticidas, através do qual foi possível selecionar um íon de quantificação e outros dois íons de identificação para cada composto. Essa informação é imprescindível para construção da tabela de programação do detetor seletivo de massas no seu modo de quantificação, ou seja, no modo SIM (do inglês "Single Ion Monitoring"), assim como o tempo de retenção dos compostos.

As Figuras IV.3 a 11 apresentam o cromatograma da solução padrão de cada OCP (janela menor), assim como o espectro de massas do mesmo. As condições cromatográficas foram: coluna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) operando a 90 °C/ 1 min (15 °C min⁻¹) 150 °C/ 1 min (6 °C min⁻¹) 230 °C/ 3 min (10 °C min⁻¹) 275 °C/ 5 min; temperaturas do injetor 270 °C ("splitless") e temperatura do detetor 300 °C. "Solvent delay" 10 min.

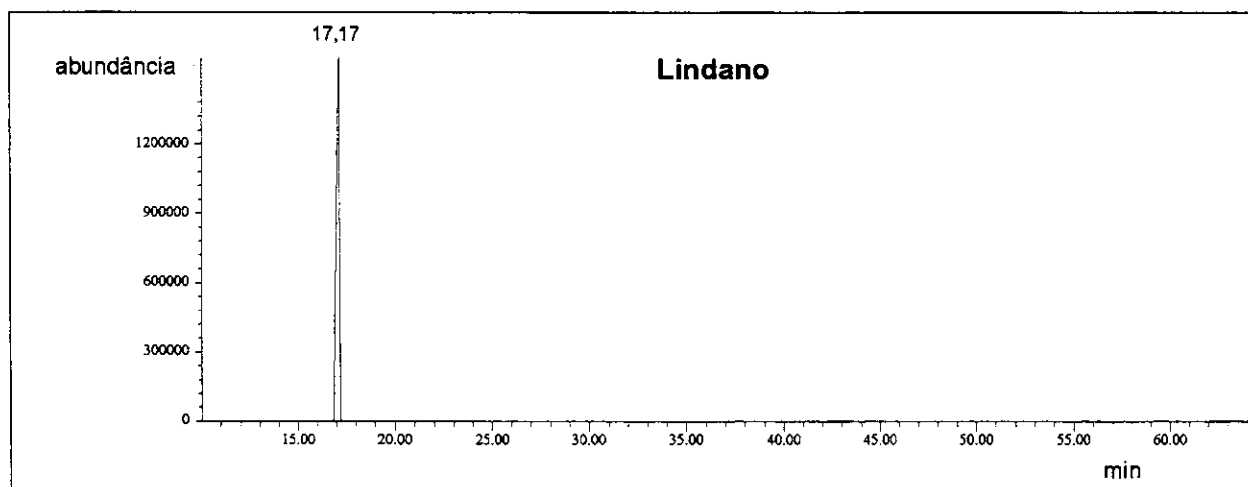


(A)

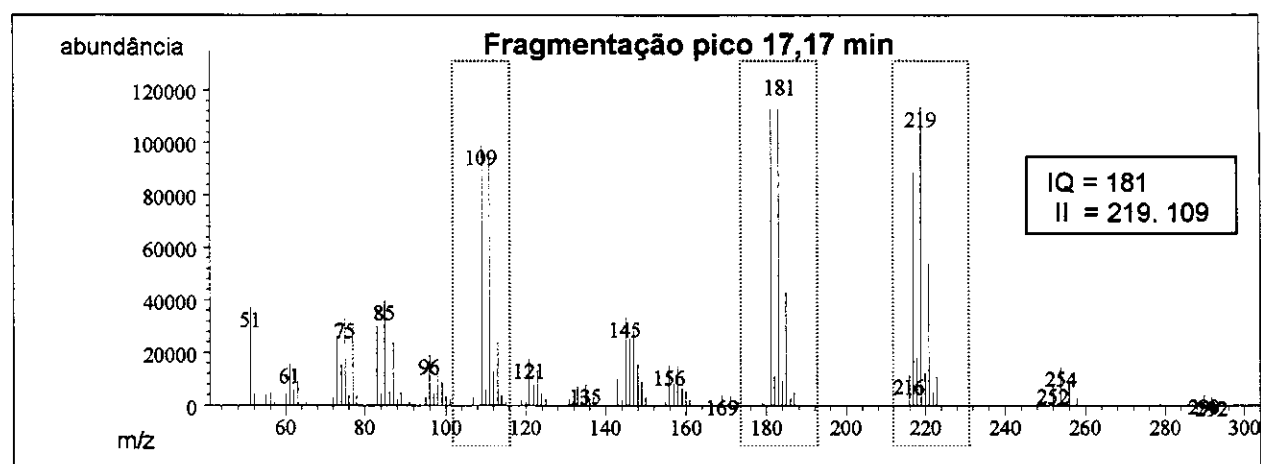


(B)

Figura IV.3 Cromatograma obtido por GC-MS ("full-scan") do padrão analítico de hexaclorobenzeno ($432 \mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano) em (A) e seu espectro de fragmentação (B). Condições cromatográficas já descritas no texto.

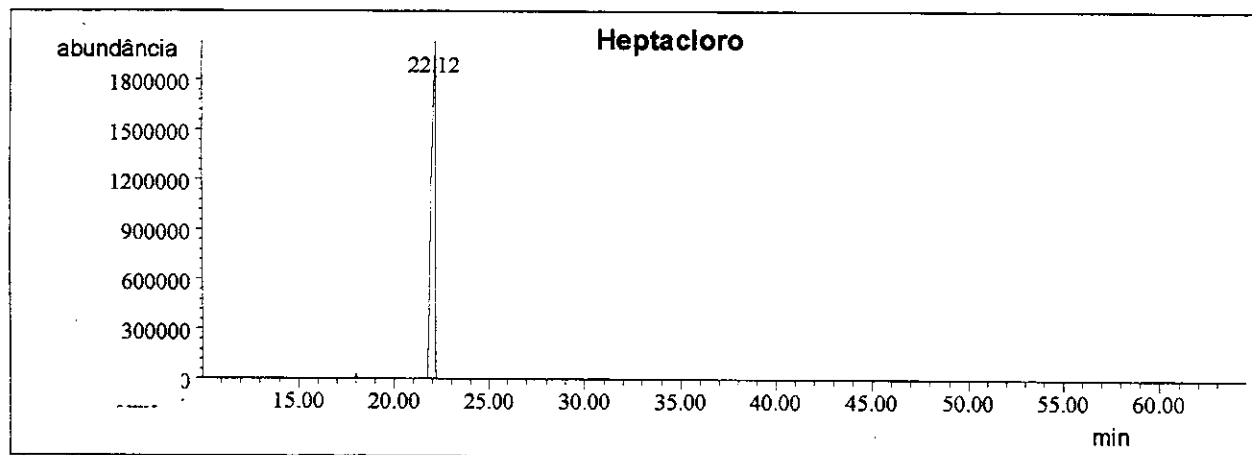


(A)

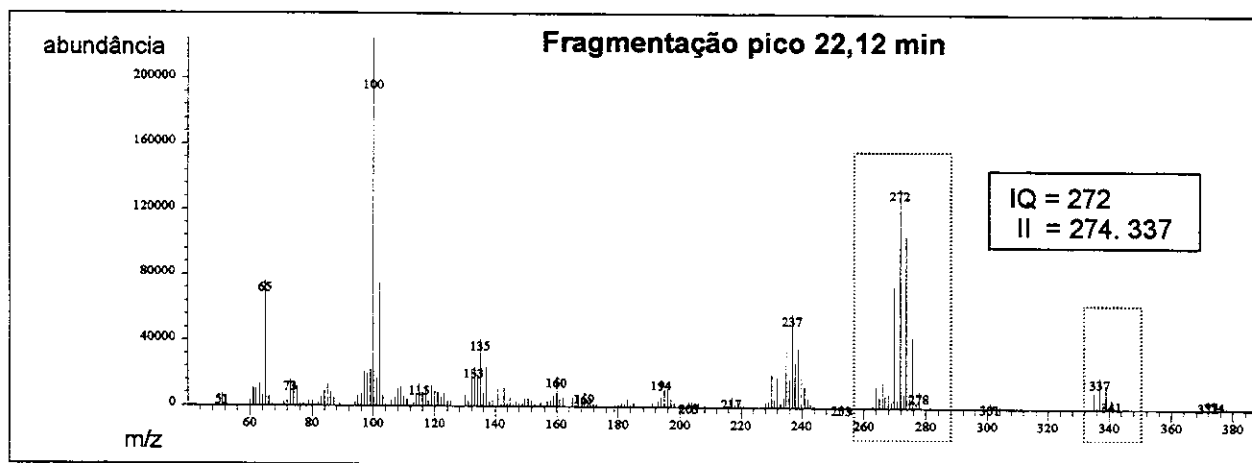


(B)

Figura IV.4 Cromatograma obtido por GC-MS ("full-scan") do padrão analítico de lindano ($420 \mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano) em (A) e seu espectro de fragmentação (B). Condições cromatográficas já descritas no texto.

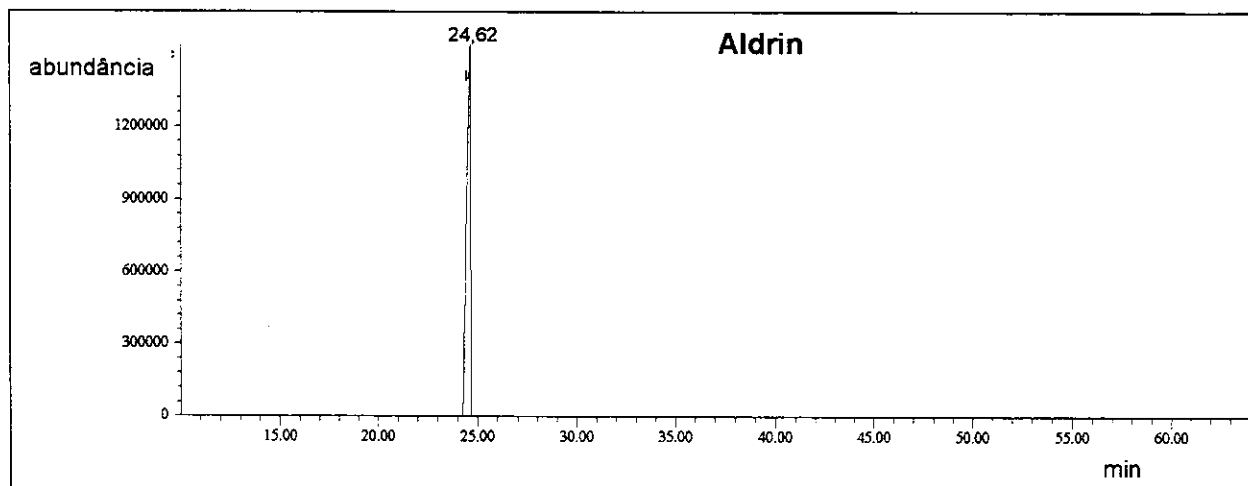


(A)

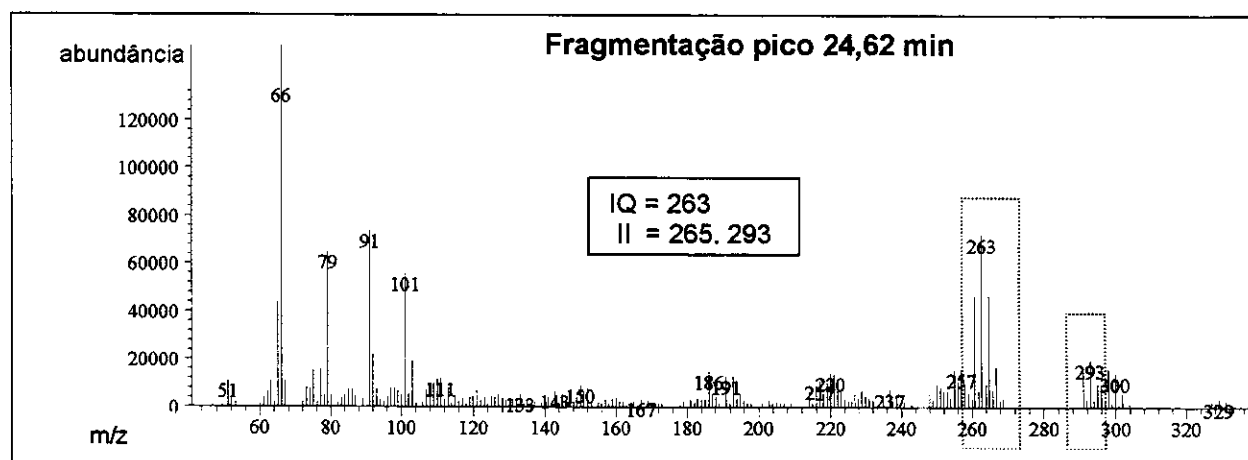


(B)

Figura IV.5 Cromatograma obtido por GC-MS ("full-scan") do padrão analítico de heptacloro ($524 \mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano) em (A) e seu espectro de fragmentação (B). Condições cromatográficas já descritas no texto.

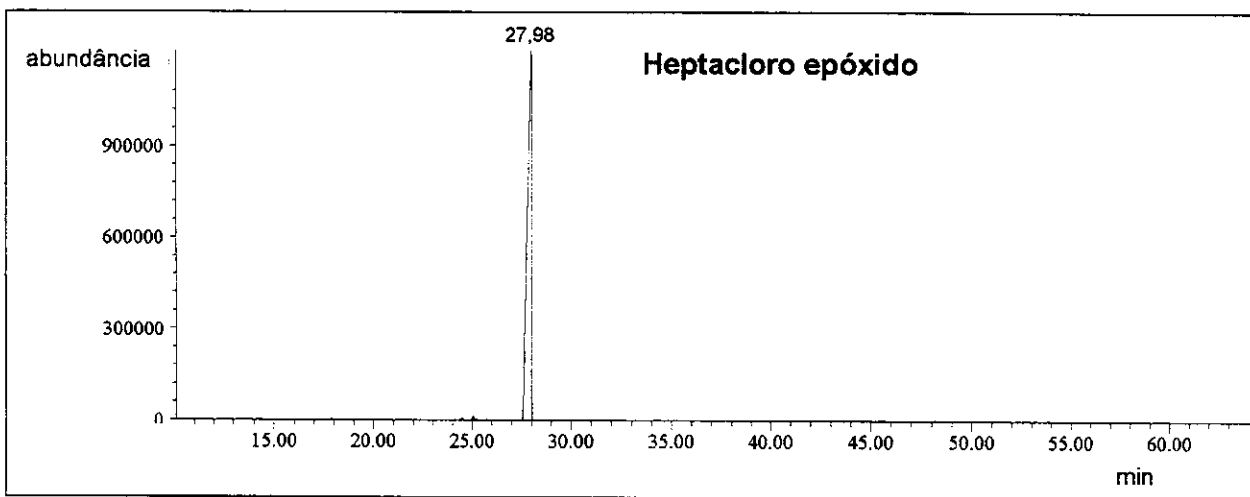


(A)

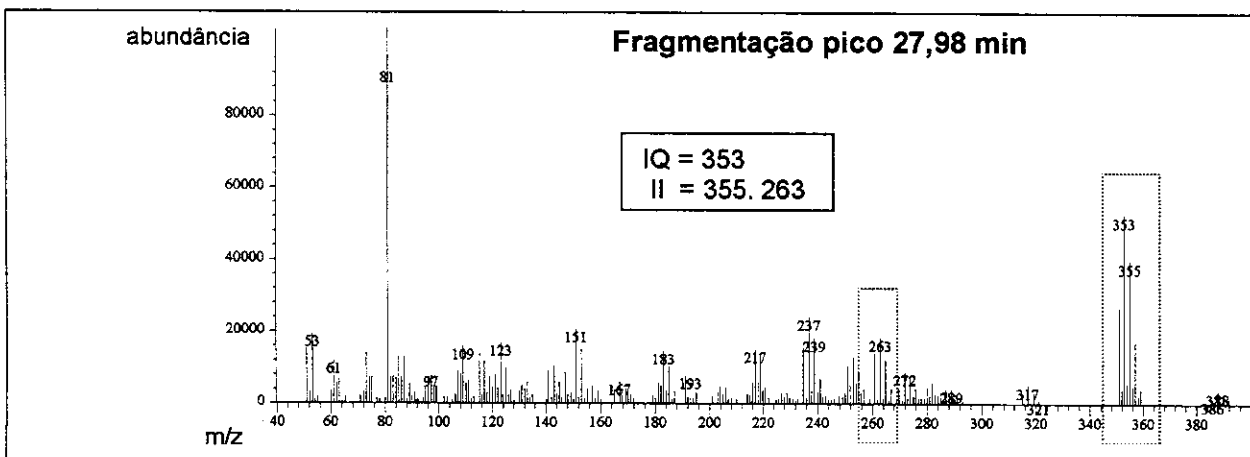


(B)

Figura IV.6 Cromatograma obtido por GC-MS ("full-scan") do padrão analítico de aldrin ($404 \mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano) em (A) e seu espectro de fragmentação (B). Condições cromatográficas já descritas no texto.

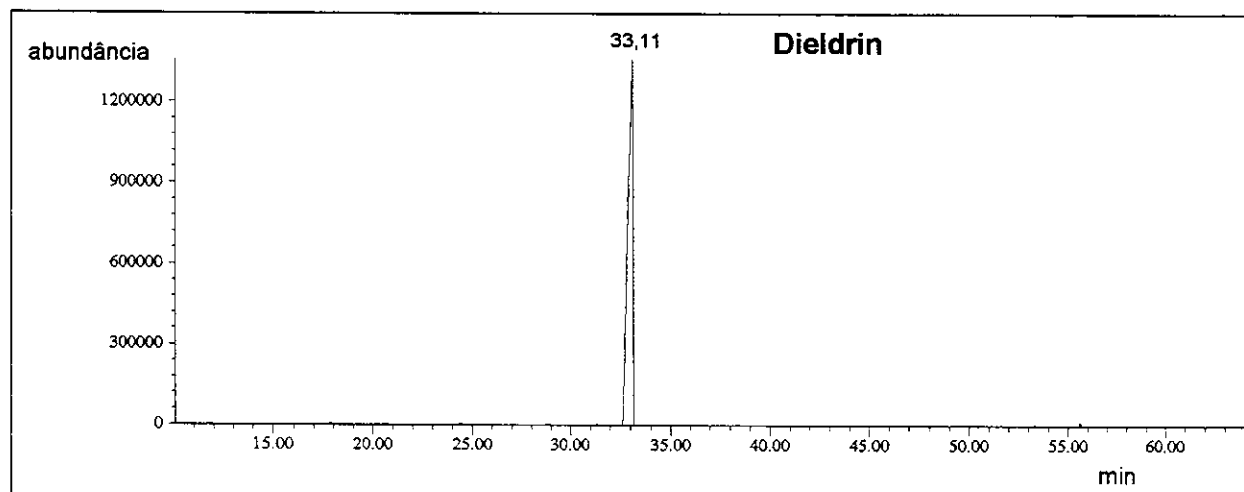


(A)

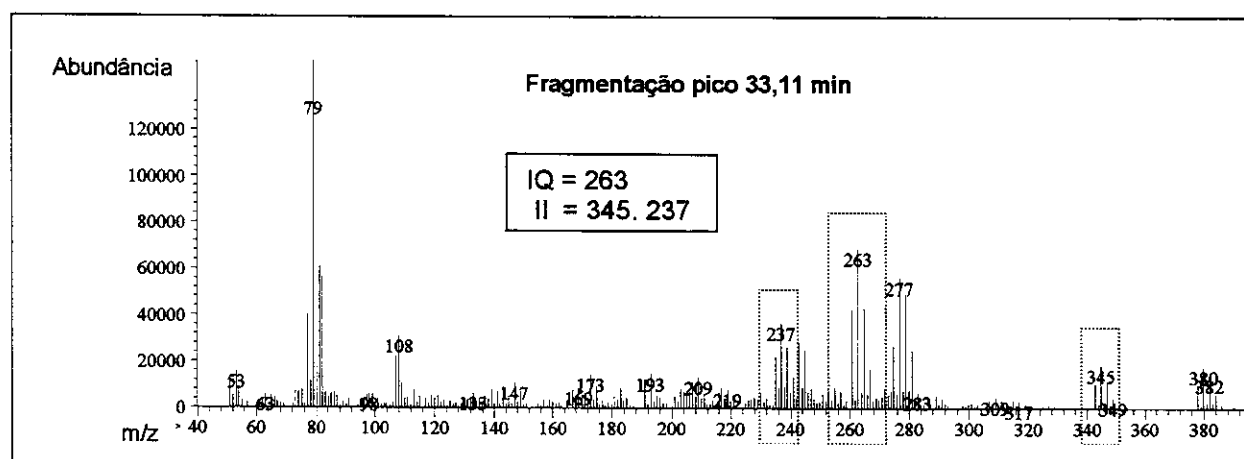


(B)

Figura IV.7 Cromatograma obtido por GC-MS (“full-scan”) do padrão analítico de heptacloro epóxido ($404 \mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano) em (A) e seu espectro de fragmentação (B). Condições cromatográficas já descritas no texto.

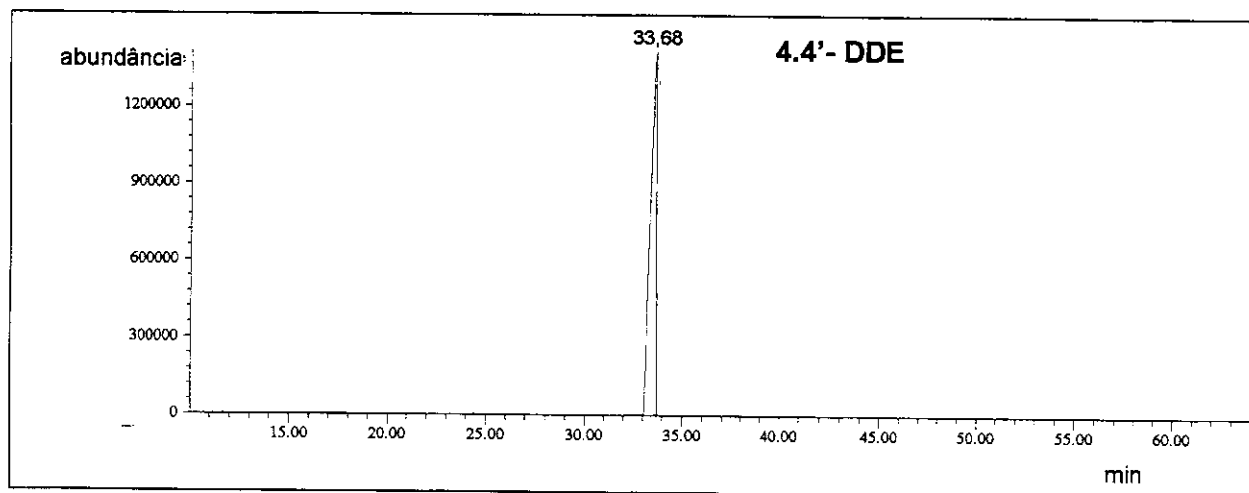


(A)

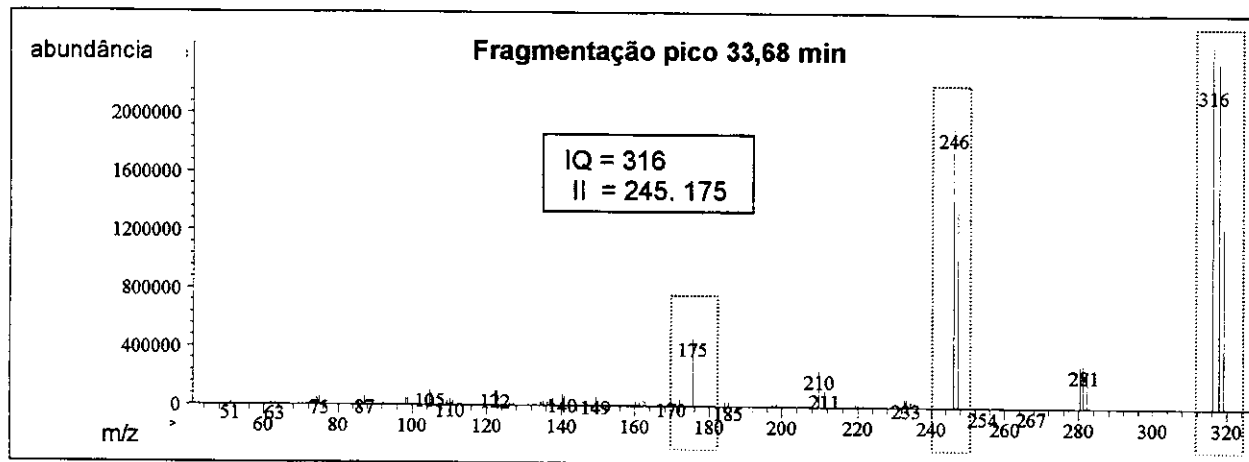


(B)

Figura IV.8 Cromatograma obtido por GC-MS ("full-scan") do padrão analítico de dieldrin ($428 \mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano) em (A) e seu espectro de fragmentação (B). Condições cromatográficas já descritas no texto.

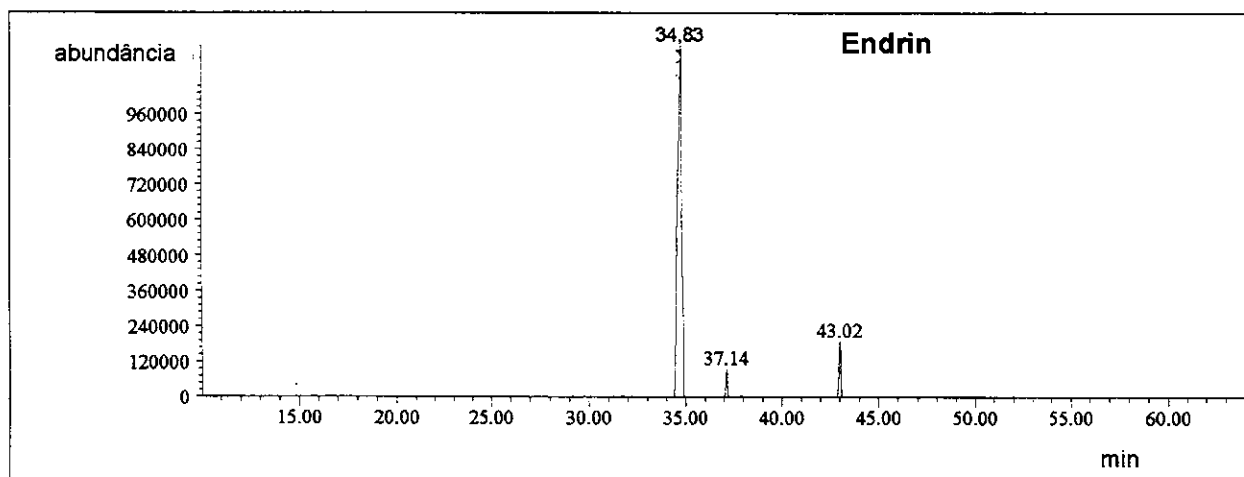


(A)

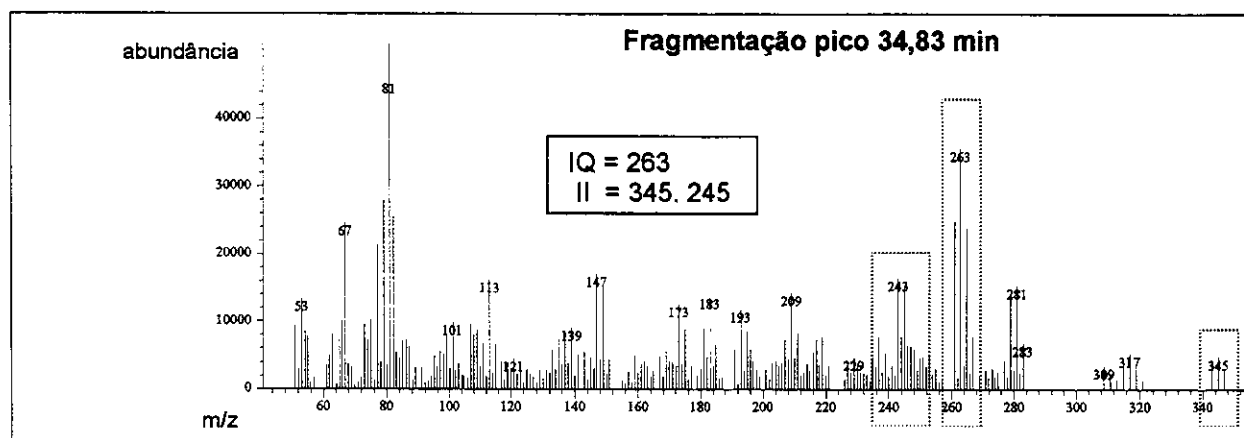


(B)

Figura IV.9 Cromatograma obtido por GC-MS ("full-scan") do padrão analítico de 4,4'-DDE ($472 \mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano) em (A) e seu espectro de fragmentação (B). Condições cromatográficas já descritas no texto.

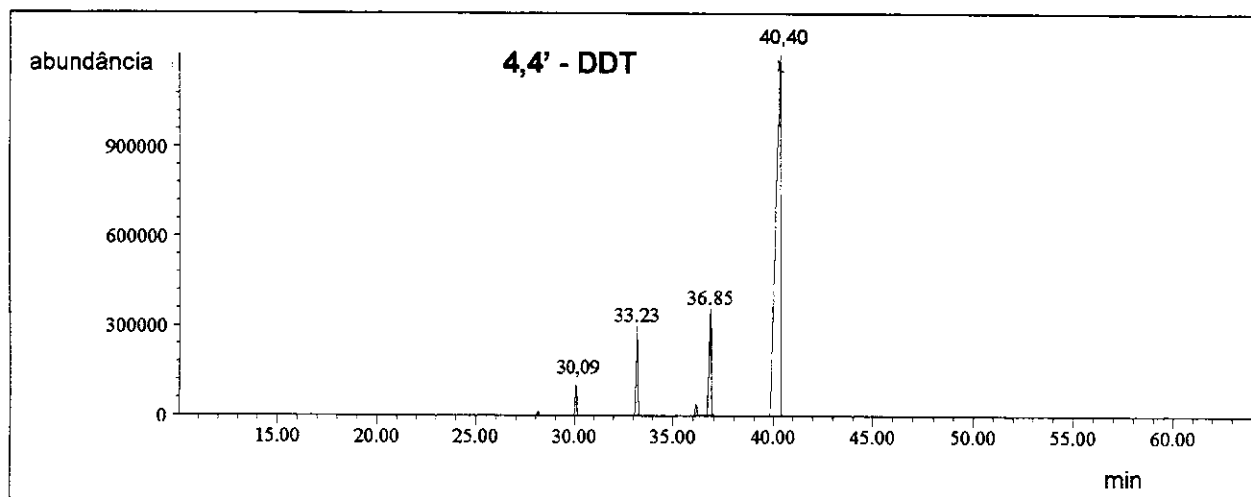


(A)

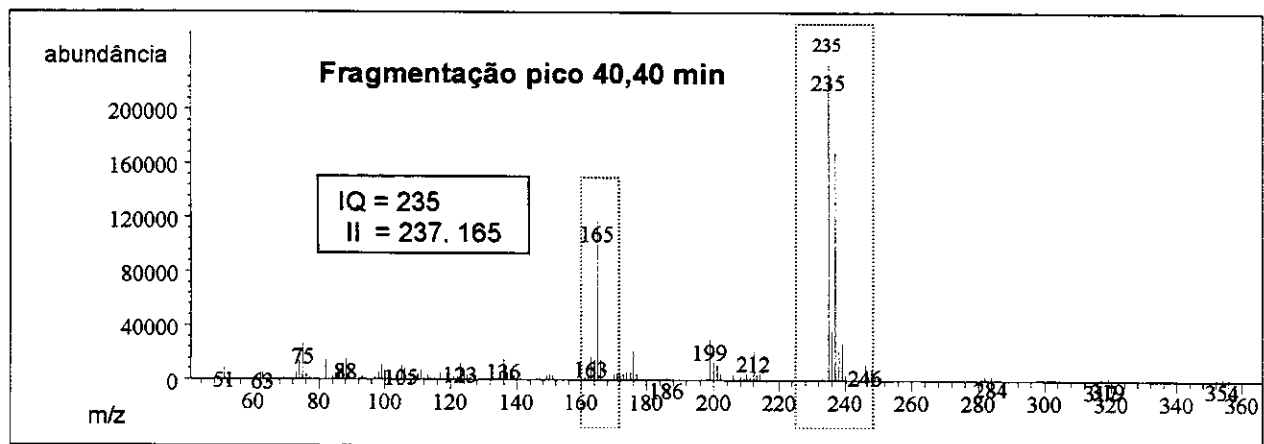


(B)

Figura IV.10 Cromatograma obtido por GC-MS ("full-scan") do padrão analítico de endrin ($420 \mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano) em (A) e seu espectro de fragmentação (B). Condições cromatográficas já descritas no texto.



(A)



(B)

Figura IV.11 Cromatograma obtido por GC-MS ("full-scan") do padrão analítico de 4,4' - DDT ($440 \mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano) em (A) e seu espectro de fragmentação (B). Condições cromatográficas já descritas no texto.

Consequentemente, o passo seguinte foi otimizar a separação cromatográfica dos pesticidas em estudo (hexaclorobenzeno, lindano, heptacloro, heptacloro epóxido, aldrin, dieldrin, endrin, 4,4' – DDT e 4,4' – DDE), utilizando como base as condições cromatográficas descritas por MANIRAKIZA e colaboradores (2000) e fazendo os ajustes necessários, de modo a otimizar a resolução entre os picos.

Várias programações de temperatura foram testadas na coluna HP-5MS e a que mostrou melhor resolução entre os picos foi: 90 °C/1 min (12 °C min⁻¹) 150 °C/ 1 min (2 °C min⁻¹) 230 °C/ 3 min (10 °C min⁻¹) 275 °C/ 25 min. O cromatograma obtido, nesta condição cromatográfica, com a mistura dos 9 padrões analíticos de OCP está apresentado na Figura IV.12.

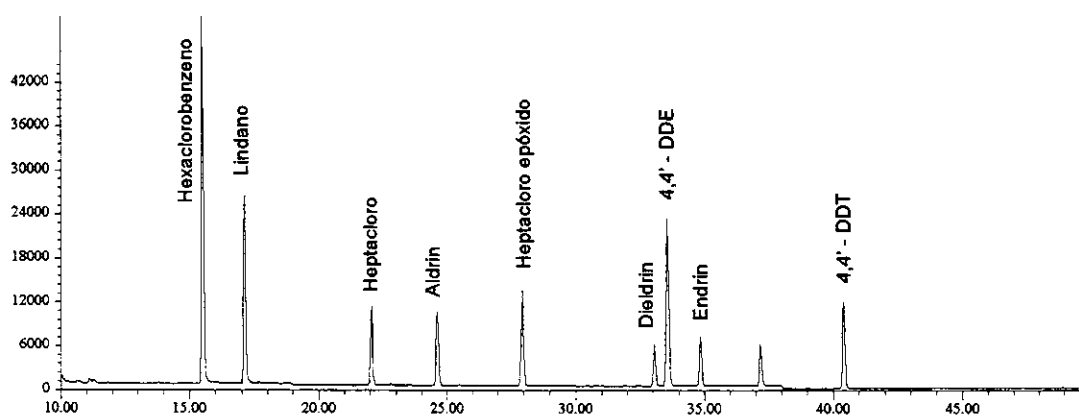


Figura IV.12 Seção do cromatograma total de íons obtido por GC-MS no modo SIM da mistura de padrões de OCP contendo: 5,11 µg mL⁻¹ de hexaclorobenzeno (t_R = 15,53 min); 4,51 µg mL⁻¹ de lindano (t_R = 17,13 min); 4,53 µg mL⁻¹ de heptacloro (t_R = 22,07 min); 4,47 µg mL⁻¹ de aldrin (t_R = 24,62 min); 4,50 µg mL⁻¹ de heptacloro epóxido (t_R = 27,97 min); 4,42 µg mL⁻¹ de dieldrin (t_R = 33,08 min); 4,05 µg mL⁻¹ de 4,4'-DDE (t_R = 33,58 min); 5,78 µg mL⁻¹ de endrin (t_R = 34,85 min) e 4,54 µg mL⁻¹ de 4,4'-DDT (t_R = 40,42 min) em hexano. Condições cromatográficas: coluna HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) operando a 90 °C/1 min (12 °C min⁻¹) 150 °C/ 1 min (2 °C min⁻¹) 230 °C/ 3 min (10 °C min⁻¹) 275 °C/ 25 min. Temperatura do injetor 270 °C ("splitless") e temperatura do detetor 300 °C.

No cromatograma da Figura IV.12 verifica-se que a resolução obtida entre os picos 6 e 7 correspondentes ao dieldrin e 4,4'-DDE, respectivamente, foi de 1,7 indicando a boa eficiência da coluna HP-5MS na separação destes pesticidas.

Finalmente, a Tabela IV.2 mostra a programação do detetor seletivo de massas para operar no modo SIM, atribuindo para cada composto os íons selecionados para sua identificação e quantificação na janela de tempo compatível com seu tempo de retenção. Para cada OCP foi selecionado um íon de quantificação referente ao fragmento mais abundante devido à sua maior detectabilidade, e outros dois fragmentos característicos do composto, utilizados para a confirmação de sua identidade.

Tabela IV.2 Íons utilizados na programação do detetor de massas no modo SIM para análise dos OCP.

Janela (min)	IQ	II	Composto
10 – 19	284	286 (88), 249 (25)	Hexaclorobenzeno
	181	219 (97), 109 (109)	Lindano
19 – 30	272	274 (84), 337 (25)	Heptacloro
	263	265 (70), 293 (41)	Aldrin
	353	355 (83), 263 (25)	Heptacloro epóxido
30 – 38	263	345 (31), 237 (47)	Dieldrin
	316	245 (4), 175 (11)	4,4' - DDE
	263	345 (24), 245 (46)	Endrin
38 – 50	235	237 (65), 165 (28)	4,4' - DDT

Legenda: IQ = íons de quantificação e II = íons de identificação.

IV.4.2 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

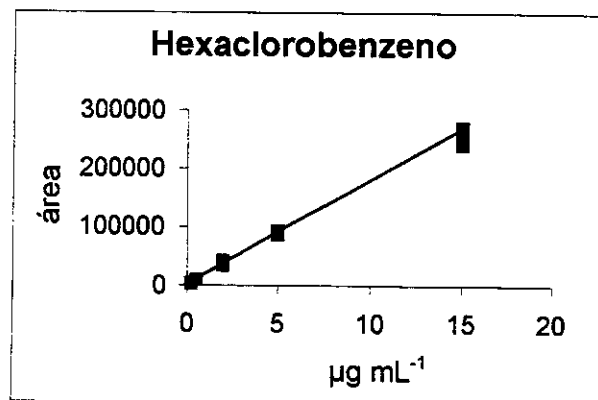
Uma vez otimizadas as condições analíticas para a separação e quantificação dos OCP por GC-MS foram construídas curvas analíticas (com 6 pontos de concentração em quintuplicata) para todos os OCP em estudo, a fim de avaliar a adequação do método para a análise de resíduos de pesticidas. Para isso foram determinados alguns parâmetros de validação do método como: faixa linear, linearidade, sensibilidade, detectabilidade e precisão intra-ensaio.

As curvas analíticas foram levantadas sem o emprego de padrão interno. Embora a utilização de padrão interno numa determinação por cromatografia gasosa aumente a precisão das injeções, a escolha do composto a ser usado como padrão interno é difícil, pois ele deve ser similar ao analito e com tempo de retenção próximo, e não estar presente na amostra. Alguns autores sugerem o uso do carbofenotion, pesticida pertencente à classe dos organofosforados, para ser utilizado como padrão interno na determinação dos OCP, mas para isto, ele deverá estar ausente nas amostras a serem analisadas. Uma outra possibilidade seria o uso de padrões deuterados.

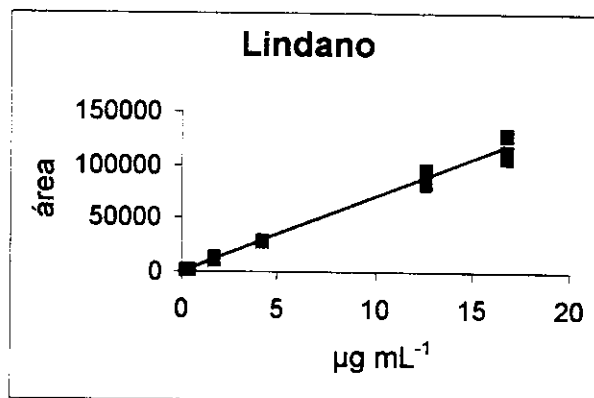
Para checar a real necessidade do emprego de padrão interno nesta análise, foi determinada a repetibilidade das injeções (injetor automático) através da precisão intra-ensaio, analisando-se o ponto central da curva analítica, cuja concentração foi em torno de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Outro fator importante foi verificar se o método possui detectabilidade suficiente para seu emprego na análise de resíduos de pesticidas, onde níveis de concentração em torno ng g^{-1} são esperados. Dessa forma, através das curvas analíticas foi determinado o limite de detecção do instrumento, que serviu como guia para o estabelecimento do limite de detecção do método e sua adequação para a determinação de resíduos de pesticidas.

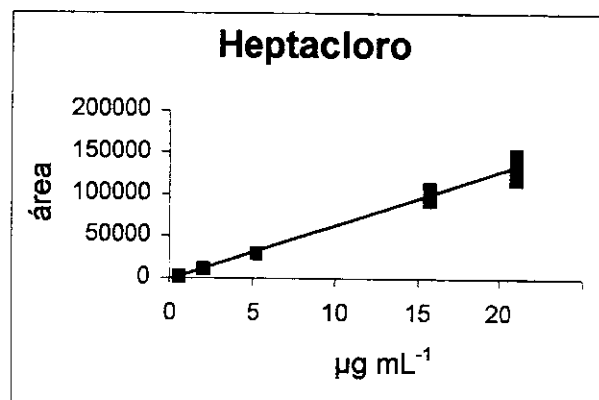
As Figuras IV.13 e 14 apresentam as curvas analíticas para o hexaclorobenzeno; lindano; heptacloro; aldrin; heptacloro epóxido; dieldrin; 4,4'-DDE; endrin e 4,4'-DDT, onde no eixo x está representada a concentração do padrão ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e no eixo y a área obtida no GC-MS operando no modo SIM.



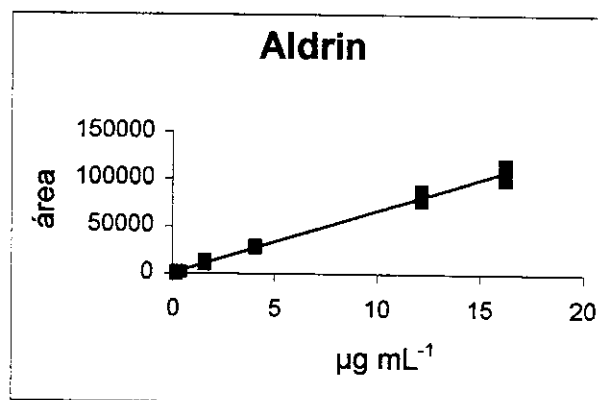
$$y = 16970 x + 2029 \quad (r = 0,9996)$$



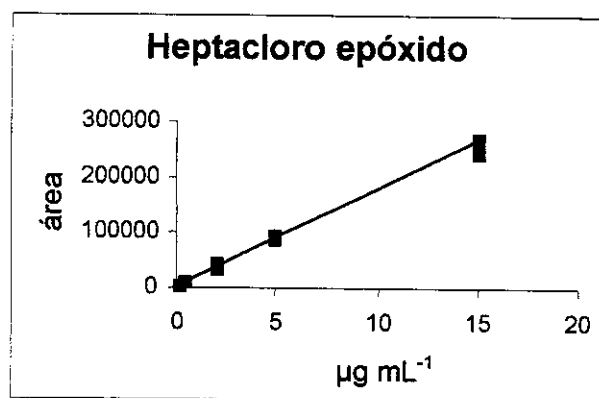
$$y = 6968 x - 231,8 \quad (0,9998)$$



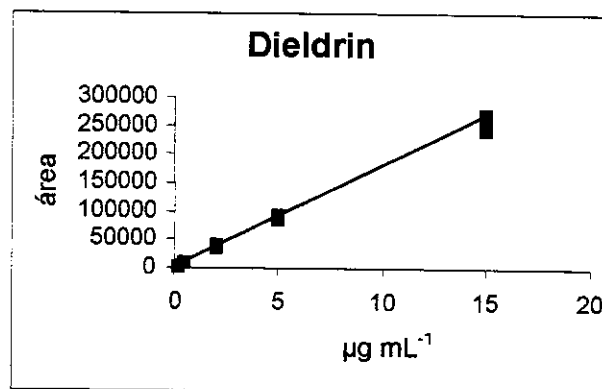
$$y = 6376 x - 1782 \quad (r = 0,9996)$$



$$y = 6647 x + 688,8 \quad (r = 0,9992)$$

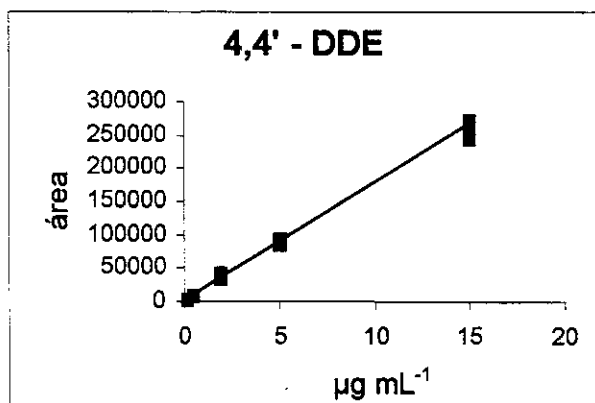


$$y = 7101 x - 63,66 \quad (r = 0,9994)$$

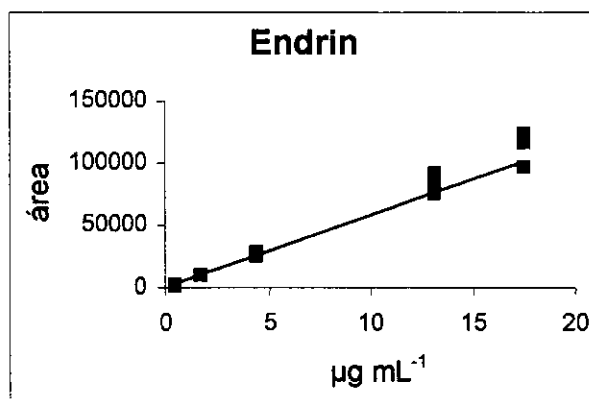


$$y = 3166 x + 330,1 \quad (r = 0,9994)$$

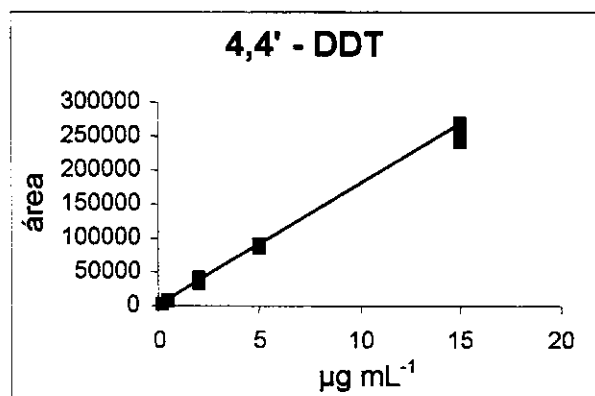
Figura IV.13 Curvas analíticas para os OCP: hexaclorobenzeno, lindano, heptacloro, aldrin, heptacloro epóxido e dieldrin.



$$y = 11120 x + 627,0 \quad (r = 0,9998)$$



$$y = 6618 x - 824,4 \quad (r = 0,9998)$$



$$y = 24840 x - 11800 \quad (r = 0,9978)$$

Figura IV.14 Curvas analíticas para os OCP: 4,4'-DDE, endrin e 4,4'-DDT.

De acordo com as curvas analíticas obtidas (Figuras IV.13 e 14) para os OCP em estudo, a Tabela IV.3 apresenta os parâmetros de validação do método.

Tabela IV.3 Dados obtidos a partir da curva analítica dos OCP.

Pesticidas Organoclorados	Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sensibilidade (u.a. mL mg^{-1})	Linearidade (r)	Detectabilidade (ng)	Precisão RSD (%)
Hexaclorobenzeno	0,200 a 15,0	17,0	0,9998	0,0060	3,00
Lindano	0,170 a 16,8	6,97	0,9999	0,016	3,60
Heptacloro	0,210 a 21,0	6,38	0,9998	0,0035	2,07
Aldrin	0,160 a 16,2	6,65	0,9996	0,0081	3,38
Heptacloro epóxido	0,160 a 16,2	7,10	0,9997	0,0069	1,95
Dieldrin	0,170 a 17,1	3,17	0,9997	0,013	3,77
4,4' – DDE	0,190 a 18,9	11,0	0,9999	0,0029	1,95
Endrin	0,170 a 17,4	6,62	0,9999	0,0056	3,96
4,4' – DDT	0,190 a 18,7	25,0	0,9990	0,0087	1,15

Legenda: (r) coeficiente de correlação; (RSD) estimativa do desvio padrão relativo ($n=5$) para concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Verifica-se que as linearidades encontradas para os 9 OCP foram adequadas, estando todos acima de 0,999.

As estimativas do desvio padrão relativo obtidos (Tabela IV.3) não foram superiores a 4%, indicando precisão entre as replicatas de injeção, atribuída ao uso do injetor automático, o que dispensou o uso de padrão interno, simplificando a análise.

A partir dos dados obtidos verifica-se que o método GC-MS apresenta sensibilidade adequada para a determinação de resíduos de OCP em plantas medicinais para atender os valores de limites máximos de resíduos. Os valores de detectabilidade por GC-MS obtidos para os pesticidas em estudo (0,003 e 0,02 ng) estão de acordo com a faixa obtida por AGUILAR e colaboradores (1997) que foi entre 0,005 ng a 10 ng para uma classe de 17 pesticidas, entre eles alguns OCP.

IV.5 CONCLUSÕES

A GC-MS, empregando uma coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) e um gradiente de temperatura de 90 °C/1 min (12 °C min⁻¹) 150 °C/ 1 min (2 °C min⁻¹) 230 °C/ 3 min (10 °C min⁻¹) 275 °C/ 25 min, mostrou ser adequada para a separação de hexaclorobenzeno, lindano, heptacloro, heptacloro epóxido, aldrin, dieldrin, endrin, 4,4' – DDT e 4,4' – DDE.

Os valores de detectabilidade obtidos comprovam que o método por GC-MS é adequado para análise de resíduos de OCP.

A precisão intra-ensaio indica, que mediante o emprego do injetor automático o uso do padrão interno é dispensável.

CAPÍTULO V – AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROCESSOS DE EXTRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE OCP EM PLANTAS MEDICINAIS.

V.1 INTRODUÇÃO

A etapa de preparo de amostra representa o ponto crítico de um protocolo analítico, consumindo cerca de 60% do tempo total de análise, mas sendo fundamental na disponibilidade do analito para sua determinação (OLIVEIRA, 2001).

Existem várias técnicas de preparo de amostra e sua escolha leva em consideração a utilização de um procedimento simples com baixo manuseio da amostra, pouco gasto de reagentes e pequena geração de resíduos e efluentes.

A extração de resíduos de pesticidas de uma amostra normalmente é realizada a partir da desintegração da matriz na presença de solvente ou mistura de solventes, utilizando para isto um homogeneizador a alta velocidade.

Seqüencialmente à extração da amostra segue a etapa de limpeza do extrato, e para isso uma das técnicas mais empregadas é a extração em fase sólida (SPE, do inglês "Solid Phase Extraction").

A SPE é uma técnica de preparo da amostra aplicada nas mais diversas áreas com o objetivo de limpeza, concentração e fracionamento da amostra. Uma grande variedade de sorventes podem ser utilizados para remover seletivamente e para concentrar os analitos, muitas vezes presentes em matrizes complexas.

Para determinações complexas, como a análise de resíduos de pesticidas em matrizes vegetais, a técnica de SPE é amplamente utilizada como procedimento de limpeza e concentração do analito presente na amostra. Entre os sorventes mais utilizados para limpeza de extratos vegetais destaca-se o florisil (TEKEL & HATRÍK, 1996), porém muitas vezes torna-se necessário o uso combinado de sorventes para melhorar a separação dos analitos dos interferentes da matriz. MANIRAKIZA e colaboradores (2000) empregaram uma coluna contendo sílica e florisil para limpeza dos extratos de plantas condimentares para determinação de pesticidas organoclorados e concluíram que o uso combinado destes dois sorventes permitia uma rápida purificação da amostra com boa recuperação dos analitos (60 a 98% para dieldrin e 4,4'-DDT, respectivamente). Porém, a posição destes sorventes na coluna (sílica na parte inferior e florisil na superior) era

importante, pois o florissil era responsável pela retenção dos interferentes mais polares da matriz e a sílica os menos polares.

Com o avanço da tecnologia e a necessidade de reduzir o volume de solventes orgânicos utilizados nas análises de resíduos de pesticidas, devido à sua toxicidade e dificuldades de aquisição e descarte, outras técnicas alternativas às convencionais têm sido empregadas, como exemplo a técnica de extração assistida por microondas (MAE, do inglês "Microwave Assisted Extraction").

A MAE pode ser efetuada em frascos abertos ou em frascos fechados através do uso de solventes com alta constante dielétrica capazes de absorver microondas. Quando utilizado o sistema de frascos fechados, o solvente é aquecido acima do seu ponto de ebulição à pressão atmosférica aumentando a velocidade e eficiência da extração.

Vários autores têm empregado com sucesso esta técnica para extração de pesticidas organoclorados em plantas (BARRIADA-PEREIRA *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2003; HO & HSIEH, 2001).

As principais vantagens no emprego da MAE são: a rapidez do processo de extração (na maioria dos casos inferior a 10 min), uso reduzido de solventes orgânicos quando comparado ao Soxhlet, possibilidade de extrações múltiplas quando usa o sistema com carrossel e a simplicidade de utilização.

HO & HSIEH (2001) associaram a microextração em fase sólida (SPME) à técnica de extração por MAE na determinação de pesticidas organoclorados em raízes de plantas medicinais chinesas fazendo a quantificação por cromatografia gasosa com detetor de captura de elétrons (GC/ECD). Neste trabalho foi utilizada água como solvente de extração, o que possibilitou a imersão direta da fibra de PDMS no extrato para partição dos analitos da amostra para a fibra e subsequente desorção dos mesmos no cromatógrafo à gás. Os resultados obtidos por HO & HSIEH (2001) na determinação de OCP em plantas chinesas foram satisfatórios e tiveram como principais vantagens a não utilização de solventes orgânicos e o reduzido manuseio da amostra evitando a criação de artefatos.

Para a determinação de pesticidas organoclorados em plantas medicinais, a WHO (1992) e a USP 25 recomendam a extração dos pesticidas da matriz sólida com solvente, seguida de extração líquido-líquido e duas etapas de limpeza, uma por cromatografia de

permeação em gel e outra subsequente em coluna de sílica gel. A quantificação é realizada por cromatografia gasosa com detetor de captura de elétrons e a confirmação através do uso de uma segunda coluna cromatográfica de polaridade diferente. Esse procedimento requer bastante manuseio da amostra o que pode gerar contaminação ou perda do analito durante as etapas de preparo, além da demanda de elevados volumes de solventes orgânicos, gerando problemas de descarte e toxicidade durante o manuseio.

Em vista destes fatores, neste capítulo foram avaliadas duas técnicas de preparo de amostra para a determinação dos OCP em folhas de guaco, espinheira santa e erva baleeira, ou seja, a SPE baseada no procedimento sugerido por MANIRAKIZA e colaboradores (2000) e a MAE associada à microextração em fase sólida (SPME) com posterior análise por GC-MS.

V.1.1 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

A SPME é uma técnica livre do uso de solventes orgânicos que foi desenvolvida por ARTHUR & PAWLISZYN (1990) para extração de poluentes orgânicos em amostras de água.

Esta técnica sofreu um grande avanço nos últimos anos, tendo sido aplicada nos mais diversos ramos da ciência, incluindo a análise de resíduos de pesticidas (WANG *et al.*, 2000; AGUILAR *et al.*, 1999; BELTRAN *et al.*, 1998; MAGDIC *et al.*, 1996; SU & HUANG, 1999).

O processo envolvido na SPME baseia-se na partição dos analitos entre a solução amostra e a fase de PDMS. Como consequência, os analitos são extraídos de acordo com seu coeficiente de partição, mas as recuperações nunca chegam a 100% e o equilíbrio da partição requer algum tempo (MIÈGE & DUGAY, 1998).

Os modelos teóricos de SPME baseiam-se nas relações de equilíbrio dos processos envolvidos. Na forma de extração mais simples, a fibra recoberta por um filme de polímero é imersa diretamente na solução-amostra sob agitação. A Equação 1 mostra

a massa n de um analito extraído, quando do equilíbrio entre as concentrações do analito na amostra e na fibra (ZHANG *et al.*, 1994).

$$n = \frac{k_{fs} \times v_f \times v_a \times c_o}{(k_{fs} \times v_f) + v_a}$$

Equação 1

onde,
 v_f = volume de recobrimento polimérico da fibra
 v_a = volume da amostra
 k_{fs} = coeficiente de partição do analito entre a matriz e o recobrimento polimérico da fibra
 c_o = concentração inicial do analito na matriz

Como o volume de recobrimento da fibra é muito pequeno, a **Equação 1** fica resumida em:

$$n \approx k_{fs} \times v_f \times c_o$$

Equação 2

Dessa forma, a quantidade de analito extraída é uma função linear da concentração inicial do analito na amostra (c_o). De acordo com a Equação 2, a massa extraída (n) aumenta com o volume de recobrimento da fibra (v_f), porém esse parâmetro é limitado na prática porque a espessura máxima é de 100 μm , considerando a utilização da fibra comercial de polidimetilsiloxano (PDMS). Já o coeficiente de partição (k_{fs}) é característico para cada par analito/ polímero de recobrimento, com isso, a eficiência de extração está diretamente ligada à escolha correta do tipo de fibra.

A Figura V.1 mostra esquematicamente o dispositivo comercial para SPME.

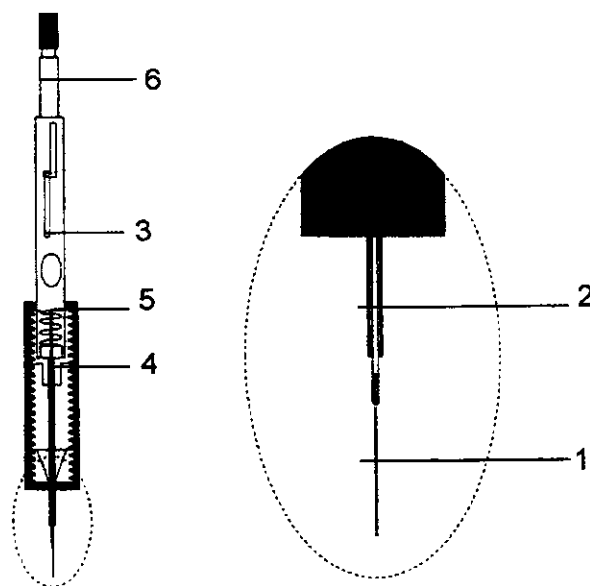


Figura V.1 Dispositivo para SPME: (1) fibra extratora; (2) agulha de aço; (3) corpo do "holder" ; (4) septo de silicone; (5) guia do "holder" e (6) êmbolo, com detalhe da extremidade fibra / agulha. Fonte: ZHANG *et al.* (1994).

Como apresentado na Figura V.1, a fibra de sílica fundida é conectada num tubo de aço inox com a finalidade de aumentar sua resistência mecânica e permitir repetidas amostragens, através do uso de um "holder".

Durante o procedimento da técnica de SPME, a fibra é primeiramente recolhida para dentro da agulha da seringa, para então, ser exposta dentro do frasco contendo a amostra através da pressão do êmbolo. Esse tempo de exposição da fibra dentro do frasco contendo a amostra deve ser otimizado a fim de permitir a extração dos analitos para a fibra.

Uma vez realizada a amostragem, a fibra é transferida para dentro do injetor do cromatógrafo a gás.

O manuseio reduzido das amostras em comparação às técnicas convencionais minimiza a possibilidade de formação de artefatos. Os analitos podem ser extraídos e transferidos diretamente ao cromatógrafo a gás, sem intervenção de solventes extratores,

cujo uso, além de ser uma possível fonte de contaminantes, é um fator complicante no gerenciamento de um laboratório analítico, pela necessidade de adoção de procedimentos de descarte e pelos riscos ocupacionais associados à sua manipulação.

A SPME não requer instrumentação complexa, envolvendo apenas a imersão de uma fibra de sílica fundida recoberta por uma fase em uma amostra líquida ou para o "headspace" do frasco contendo a amostra. Os pesticidas ou outros compostos de interesse passam para a fase da fibra através de mecanismos de partição ou adsorção, e são termicamente desorvidos no injetor do cromatógrafo a gás e transferidos para a coluna cromatográfica.

O tempo requerido para estabelecimento do equilíbrio depende da constante de distribuição dos analitos e da espessura do filme e a seletividade pode ser alterada pela mudança do tipo de fibra utilizada.

Os fatores que mais interferem na recuperação dos analitos são: agitação da amostra, adição de sal, ajuste de pH, análise por imersão direta ou por "headspace". Portanto, as análises por SPME necessitam de otimização dos parâmetros para uma melhor eficiência e para isto uma das ferramentas mais utilizadas é o planejamento experimental.

Os métodos de planejamento e otimização, entre eles o de superfície de resposta, são muito utilizados na prática experimental, pois requerem um pequeno número de ensaios e utilizam operações matemáticas simples.

A metodologia de superfície de resposta permite verificar através de um número em menor de experimentos, a influência de diversas variáveis na resposta, bem como otimizá-las.

Para a otimização das condições operacionais de SPME, as principais variáveis estudadas são: tipo de fibra, tempo de extração e força iônica (relacionadas à etapa de extração) e ainda temperatura e tempo de desorção (relacionadas à etapa de desorção).

BELTRAN e colaboradores (2000) apresentam uma revisão sobre o emprego da técnica de SPME na determinação de pesticidas em matrizes como água, solo, alimentos e fluídos biológicos. Para o grupo dos pesticidas organoclorados, a fibra mais utilizada é a PDMS devido às suas características apolares, sob imersão direta na amostra.

Em geral o tempo de extração requerido para os pesticidas organoclorados é longo (HWANG & LEE, 2000). No trabalho de HO & HSIEH (2001) a fibra utilizada foi a PDMS sob imersão direta na amostra, tempo de extração de 90 min à temperatura ambiente, temperatura de desorção 270 °C e tempo de desorção de 2 min.

V.2 OBJETIVOS

O objetivo geral foi estabelecer um método para a determinação de OCP em plantas medicinais (folhas), empregando para tanto a GC-MS no modo SIM para quantificação.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar diferentes técnicas de preparo de amostra como a extração assistida por microondas associada a microextração em fase sólida (MAE-SPME) e extração em fase sólida (SPE).
- Avaliar a presença dos OCP no Campo Experimental de Paulínia, através da análise de algumas espécies perenes cultivadas como guaco, espinheira-santa e erva baleeira e em amostras de guaco disponíveis no mercado.

V.3 EXPERIMENTAL

V.3.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

As plantas utilizadas nesta etapa do trabalho foram: *Mikania laevigata* Schultz Bip (guaco), *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) e *Cordia curassavica* (erva baleeira) provenientes do cultivo em Paulínia. Os procedimentos de coleta, secagem e moagem estão descritos no capítulo III.

Também foram analisadas amostras de guaco obtidas no comércio, proveniente de uma distribuidora de plantas medicinais de São Paulo e de uma farmácia de manipulação de Jundiaí. Estas amostras foram moídas no moinho de facas junto com gelo seco e armazenadas em freezer até o momento da análise.

V.3.2 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS

Os reagentes utilizados para avaliação destas técnicas de extração foram: n-hexano grau pesticida (Tedia, Fairfield, OH, EUA), diclorometano para HPLC (Mallinckrodt Baker, Kentucky, EUA), sulfato de sódio anidro para análise de resíduo (Mallinckrodt Baker, MA, EUA), Florisil® (60-100 mesh, Merck, EUA), sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm, Merck, EUA) e água destilada e purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Os padrões analíticos utilizados foram adquiridos da Chem Service (West Chester, PA, EUA). Foram eles: hexaclorobenzeno 99 %, lindano 98,9 %, heptacloro 99,5%, heptacloro epóxido (isômero B) 99,5 %, aldrin 98,5 %, dieldrin 98,9 %, endrin 99,0 %, 4,4'-DDE 99,3 % e 4,4'-DDT 98,8 % de pureza.

V.3.3 MATERIAL PARA SPME

- “Holder” para SPME (Supelco, Bellefonte, PA, EUA)
- Fibras de polidimetilsiloxano 100 µm (Supelco, Bellefonte, PA, EUA)
- Frascos de vidro com 38 mL de capacidade e boca de 20 mm
- Lacres de alumínio de 20 mm de diâmetro
- Septos de teflon/silicone (Pierce, Rockford, IL, EUA)
- Lacrador para frascos com 20 mm de diâmetro (Merse, Campinas, SP, Brasil)

V.3.4 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados na etapa de extração e limpeza das amostras foram:

- Sistema homogeneizador Ultra-Turrax, Polytron PT 2000 (Kinematica AG, Suíça)
- Centrifuga 5500 D (Cientec, Piracicaba, SP, Brasil)
- Rotaevaporador Fisatom 802 D (Fisatom, São Paulo, SP, Brasil)
- Sistema à vácuo para SPE com capacidade para 12 cartuchos (Alltech, Deerfield, IL, EUA)
- Banho com recirculação de água (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil)
- Forno de microondas para 12 frascos (Provector, Jundiaí, SP, Brasil)

Na Figura V.2. está ilustrado o sistema de homogeneização tipo Ultra-Turrax utilizado nos experimentos.

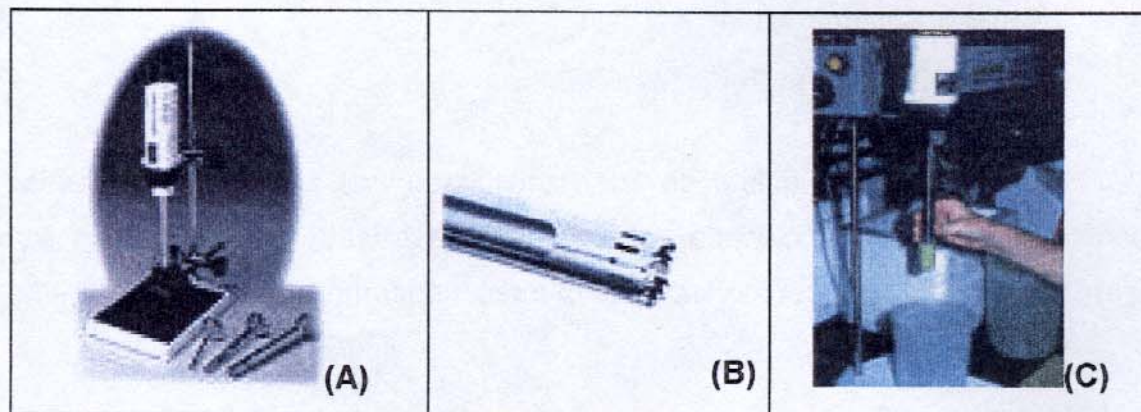


Figura V.2 Aparelho homogeneizador de amostras Polytron, em (A) visão geral do sistema, (B) a haste utilizada modelo PT2000 e (C) extração de amostra.

Na Figura V.3 está apresentado o sistema utilizado para os ensaios de SPME, constituído por um banho termostatzado com recirculação de água (1) conectado a um reator encamisado (2) e agitador magnético (3).

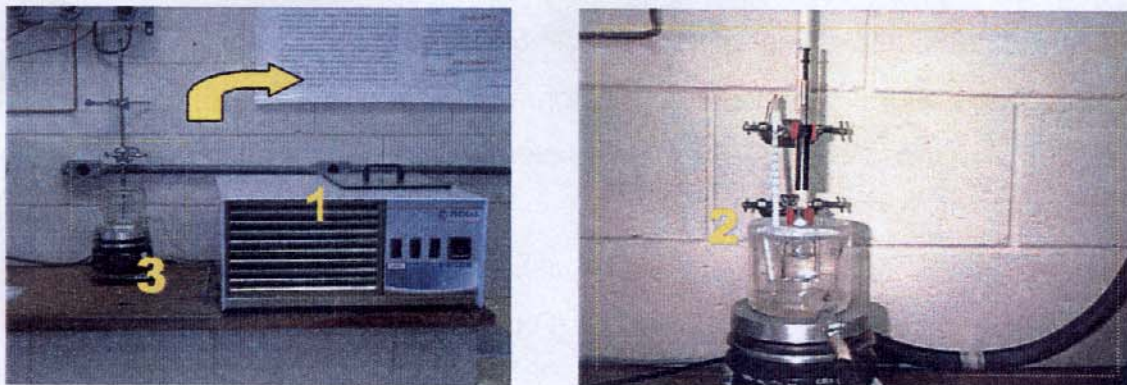


Figura V.3 Foto do sistema utilizado para a microextração em fase sólida. Do lado esquerdo aparece o banho de recirculação de água (1) ligado num pequeno reator encamisado (2) e do lado direito o frasco dentro do banho do reator com a fibra inserida e sob uma placa de agitação magnética (3).

A Figura V.4 mostra a foto do forno de microondas utilizado nos ensaios e os frascos de teflon, onde era colocada a amostra para extração. Os frascos de teflon eram inseridos num suporte para acomodação no carrossel do forno.



Figura V.4 Foto do forno de microondas Provector utilizado para os experimentos (à esquerda) frascos de teflon (1), onde a amostra é colocada para extração, e o frasco inserido no suporte (2) para acomodação dentro do forno.

V.3.5 INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As análises cromatográficas foram realizadas no cromatógrafo à gás HP 5890 serie II acoplado ao detetor seletivo de massas HP 5971 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, EUA) e injetor automático HP 7673. A coluna capilar utilizada foi HP-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m) operando a 90 °C/1 min (12 °C min⁻¹) 150 °C/ 1 min (2 °C min⁻¹) 230 °C/ 3 min (10 °C min⁻¹) 275 °C/ 25 min. As injeções foram feitas no modo "splitless" com o injetor a 270 °C e detetor a 300 °C. A vazão do gás de arraste (hélio) foi de 1 mL min⁻¹.

Para a quantificação dos pesticidas, o detetor seletivo de massas foi utilizado no modo SIM, atribuindo a cada pesticida o fragmento mais abundante para ser usado como íon de quantificação (IQ) e outros dois íons para identificação (II), considerando o tempo de eluição de cada analito (Tabela V.1.). Os tempos de retenção e as abundâncias relativas de IQ e II foram utilizados como critério de identificação.

As condições de análise foram estabelecidas previamente e estão descritas no capítulo III.

V.3.6 TRATAMENTO DOS DADOS ESTATÍSTICOS

A metodologia de superfície de resposta permite verificar através de um número reduzido de experimentos, a influência de diversas variáveis na resposta, bem como otimizá-las. Neste trabalho, as condições operacionais do MAE e do SPME foram otimizadas através do uso de 2 planejamentos experimentais do tipo fatorial completo 2^2 e triplicata do ponto central. Para gerar as superfícies de resposta nos planejamentos foi utilizado o software "Statistica" (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA) versão 5.5.

V.4 PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE SPE

A partir da metodologia sugerida por MANIRAKIZA e colaboradores (2000) para determinação de OCP em plantas condimentares, foram feitas algumas adaptações e otimizações no procedimento analítico, para sua utilização nas plantas em estudo (folhas de guaco, espinheira santa e erva baleeira).

As principais modificações foram o uso do homogeneizador na etapa de extração, alteração da força do eluente e volume de eluição na etapa de limpeza e a quantificação por GC-MS ao invés de GC/ECD.

As fortificações foram feitas através da adição volumétrica de 1,00 mL da mistura padrão de OCP em hexano sobre 2,00 g da planta seca e moída.

A otimização da técnica de SPE, ou, mais precisamente da composição do eluente bem como do volume necessário para eluição dos OCP da coluna de sílica e florisil, foi realizada mediante a análise de amostras fortificadas juntamente com seu branco, a fim de avaliar a taxa de recuperação.

V.4.1 PREPARO DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA SPE

Foram construídas curvas analíticas para os OCP em estudo a partir de soluções estoque ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$) contendo a mistura dos padrões analíticos em hexano para concentrações de 0,0200; 0,100; 0,500; 1,00; 2,00; 5,00; 10,0 e $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

V.4.2 ANÁLISE DE AMOSTRAS UTILIZANDO SPE

O procedimento analítico para determinação dos OCP nas plantas em estudo, baseado no trabalho de MANIRAKIZA *et al.* (2000), já adaptado e otimizado para as plantas em estudo, iniciou com a extração de 2 g da amostra (folhas secas moídas) em 15 mL de uma mistura hexano:diclorometano (4:1 v/v) durante 1 min no homogeneizador. O extrato obtido foi submetido à centrifugação a 2000 rpm (5950 g) durante 12 min e o sobrenadante transferido para balão de fundo redondo de 125 mL. O sedimento foi reextraído com mais 10 mL da mistura hexano:diclorometano (4:1 v/v) e novamente centrifugado. Os sobrenadantes foram combinados no balão de fundo redondo e concentrados em rotaevaporador (40°C - 45°C) até o volume aproximado de 1 mL.

Para a etapa de limpeza da amostra foram utilizadas seringas de vidro de 5 mL (75 x 13 mm) empacotadas sucessivamente com 2 g de sílica Gel 60 (0,063 – 0,200 mm), 1,5 g de Florisil® e 0,65 g de sulfato de sódio anidro. Esta coluna foi adaptada no sistema à vácuo e condicionada com 6 mL de diclorometano. Em seguida, foi adicionada a amostra (aproximadamente 1 mL) e a eluição dos OCP foi feita com 45 mL da mistura de hexano : diclorometano (6:4 v/v). O eluato foi concentrado até *secura*, diluído com hexano para 1 mL e $1 \mu\text{L}$ injetado automaticamente no GC-MS. A quantificação foi realizada por padronização externa, com as concentrações descritas em V.4.1.

V.4.3 ENSAIO DE RECUPERAÇÃO

As amostras foram fortificadas em três diferentes níveis de concentração em triplicata, totalizando nove fortificações para a espinheira santa e em dois níveis de concentração (triplicata) para o guaco e erva baleeira.

Para fortificação das amostras foi utilizada uma solução contendo a mistura dos padrões analíticos de OCP preparada em hexano.

V.5 PROCEDIMENTO PARA AVALIAÇÃO DA TÉCNICA MAE-SPME-GC-MS

O artigo de HO & HSIEH (2001) serviu como base para definir as principais variáveis na otimização das condições de extração por MAE, bem como definir a faixa de variação de cada variável a ser utilizada na construção de um planejamento experimental.

Para a avaliação da técnica de MAE-SPME-GC-MS foi necessário otimizar as condições da extração assistida por microondas, cujo procedimento está descrito no item V.5.1 e as condições de análise por SPME-GC-MS, também realizada mediante planejamento experimental descrito no item V.5.2.

V.5.1 PROCEDIMENTO PARA OTIMIZAÇÃO DA MAE

A proporção de amostra e solvente utilizada para extração dos OCP na MAE foi baseada no artigo de HO & HSIEH (2001), porém as condições de operação do forno foram otimizadas, uma vez que se tratava de outro aparelho e outro tipo de amostra.

Para isso, foi utilizado um planejamento composto central 2^2 com triplicata do ponto central, totalizando 11 ensaios, onde as variáveis estudadas foram a potência do forno e o tempo de extração. As faixas das variáveis estudadas, bem como as condições

experimentais de cada ensaio estão apresentados na Tabela V.1. Como resposta foi utilizada a massa recuperada dos pesticidas através de análise por SPME-GC-MS.

Os ensaios no MAE foram realizados com 1,00 g da planta seca e pulverizada e 20 mL de água destilada e purificada no sistema Milli-Q. O tempo de extração e a potência foram otimizados através de um planejamento experimental (Tabela V.1).

Tabela V.1 Planejamento composto central 2^2 para otimização das condições de extração dos OCP por MAE.

VARIÁVEIS		NÍVEIS				
		(-1,4)	(-1)	(0)	(+1)	(+1,4)
(x ₁) Tempo de extração (min)		1,5	4	10	16	18,5
(x ₂) Potência (W)		96	200	450	700	803
ENSAIOS	x ₁	x ₂				
01	4	200				
02	4	700				
03	16	200				
04	16	700				
05	1,5	450				
06	18,5	450				
07	10	96				
08	10	803				
09	10	450				
10	10	450				
11	10	450				

O procedimento de MAE foi realizado sempre com o mesmo número de amostras dentro do forno, a fim de distribuir homogeneamente a energia de microondas entre as amostras. Sendo assim, cada ensaio do experimento foi realizado em duplicata, com 6

frascos dentro do forno de microondas, 4 deles contendo 20 mL de água (branco) e os outros 2 contendo a amostra (1,00 g) fortificada com cerca de 25 ng g⁻¹ dos OCP e 20 mL de água, na potência e tempo estabelecidos para cada ensaio.

Ao término de cada ensaio, os frascos contendo amostra foram retirados do forno e colocados em banho com água durante aproximadamente 30 min para acelerar o resfriamento. Os frascos foram abertos e seu conteúdo transferido para tubos de centrífuga de 20 mL com tampa, centrifugados a 20.000 (g) durante 6 min e mantidos sob refrigeração para serem analisados por SPME-GC-MS.

V.5.2 PROCEDIMENTO PARA OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SPME-GC-MS

Segundo a literatura, para a determinação dos OCP, a fibra mais recomendada é a de PDMS devido à sua baixa polaridade. Na revisão sobre a aplicação da técnica de SPME para determinação de OCP, publicada por BELTRAN e colaboradores (2000), a fibra de PDMS foi utilizada sob imersão direta na amostra na maioria dos trabalhos citados, desde matrizes mais simples como água até as mais complexas como mel, suco de laranja, vinho e frutas em geral. No trabalho de HO & HSIEH (2001), onde as matrizes eram plantas medicinais, essa informação se confirmou, ou seja, a fibra de PDMS também foi utilizada sob imersão direta.

Sendo assim, a otimização das condições de operação da SPME foi feita através de um planejamento experimental do tipo fatorial completo 2² com triplicata do ponto central, utilizando como variáveis o tempo de exposição da fibra e a temperatura do banho (Tabela V.2). A resposta dos ensaios foi determinada em termos da massa recuperada dos pesticidas através da análise por GC-MS.

Tabela V.2 Ensaios do planejamento experimental para otimização das condições operacionais da fibra de PDMS.

VARIÁVEIS	NÍVEIS				
	(-1,4)	(-1)	(0)	(+1)	(+1,4)
(x ₁) Tempo de exposição (min)	5,5	20	55	90	105
(x ₂) Temperatura do banho (°C)	21,7	30	50	70	78

ENSAIOS	x ₁	x ₂
01	20	30
02	20	70
03	90	30
04	90	70
05	5,5	50
06	105	50
07	55	21,7
08	55	78
09	55	50
10	55	50
11	55	50

Foram mantidos constantes o tempo de dessorção da fibra em 5 min e a temperatura de dessorção em 270 °C. Para a realização dos ensaios foram utilizados 25 mL de uma solução contendo cerca de 25 ng de cada pesticida organoclorado contida num frasco de 38 mL lacrado e termostatizado sob agitação magnética constante. Em seqüência, a fibra de PDMS foi exposta, imersa na solução durante o tempo previsto no planejamento experimental e imediatamente introduzida no injetor do cromatógrafo. O tempo de permanência da fibra no injetor foi de 5 min.

Para obtenção dos resultados, em termos de massa recuperada de pesticida, foram construídas curvas analíticas para os OCP através da injeção direta (sem uso da fibra) da mistura de padrões na faixa entre 0,17 e 7 ng. Os resultados obtidos em termos de massa recuperada de cada composto foram processados pelo programa "Statistic" para obtenção das superfícies de resposta.

V.6 RESULTADOS

A seguir estão apresentados os resultados obtidos com a avaliação dos dois diferentes métodos de preparo de amostra, o primeiro envolvendo a extração com solvente seguida da limpeza em coluna de florisil e sílica (SPE) e análise por GC-MS e o segundo utilizando a técnica hifenada MAE-SPME-GC-MS.

Também estão apresentados os valores obtidos na determinação dos OCP nas plantas cultivadas em Paulínia (guaco, espinheira santa e erva baleeira), que por tratarem de amostras perenes estiveram sujeitas ao acúmulo de poluentes da região, assim como nas amostras comerciais de guaco.

V.6.1 AVALIAÇÃO DO MÉTODO UTILIZANDO A TÉCNICA DE SPE

O preparo de amostra por SPE foi baseado no trabalho de MANIRAKIZA e colaboradores (2000), no qual foi recomendado como eluente dos OCP uma mistura de hexano:diclorometano 80:20 v/v numa coluna contendo florisil e sílica. No entanto, empregando as condições recomendadas pelos autores para amostra de guaco fortificada uma recuperação menor do que 50% foi obtida, necessitando de um aumento da polaridade do eluente para hexano:diclorometano 60:40% v/v, além de um maior volume de solvente. As quantificações dos OCP foram realizadas mediante curva externa, sendo que a mesma foi realizada de tal forma que partindo de 2 g de amostra seria possível quantificar os OCP.

O método foi validado, usando-se as seguintes figuras de mérito: faixa linear, sensibilidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão através do teste de recuperação (Tabela V.3).

Tabela V.3 Parâmetros de validação para o método utilizando SPE.

OCP	Faixa linear (ng mL ⁻¹)	Sensibilidade (u.a. mL ng ⁻¹)	Linearidade (r)	LOD * (ng g ⁻¹)	LOQ ** (ng g ⁻¹)
Hexaclorobenzeno	5,00 a 5,11.10 ³	22,8	0,9992	1,0	5,0
Lindano	20,0 a 4,51.10 ³	12,4	0,9994	7,0	20
Heptacloro	8,00 a 4,53.10 ³	7,30	0,9990	2,0	8,0
Aldrin	5,00 a 4,47.10 ³	7,70	0,9999	1,0	5,0
Heptacloro epóxido	7,00 a 4,50.10 ³	7,40	0,9999	2,0	7,0
Dieldrin	10,0 a 8,84.10 ³	3,10	0,9999	3,0	10
4,4' - DDE	2,00 a 4,05.10 ³	11,5	0,9997	0,50	2,0
Endrin	30,0 a 5,78.10 ³	3,30	0,9998	9,0	30
4,4' - DDT	3,00 a 4,54.10 ³	7,90	0,9993	0,80	3,0

Legenda: (*) LOD estimado em relação ao ruído da linha de base (3 vezes); (**) LOQ estimado em relação ao ruído da linha de base (10 vezes) e verificado experimentalmente e (r) coeficiente de correlação.

Os coeficientes de correlação apresentaram valores acima de 0,999, considerados satisfatórios para fins quantitativos.

A exatidão do método foi avaliada através de teste de recuperação, utilizando amostras fortificadas de guaco e espinheira santa (Tabelas V.4 e V.5, respectivamente).

Tabela V.4 Teste de recuperação (exatidão) para as folhas de guaco.

OCP	Fortificações ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperações (%)	Precisão RSD (%)
Hexaclorobenzeno	0,436	108	1,5 (n = 4)
	1,02	70,0	6,0 (n = 6)
Lindano	0,405	94,1	4,9 (n = 4)
	0,810	70,4	4,7 (n = 6)
Heptacloro	0,420	118	1,5 (n = 4)
	0,840	76,9	6,4 (n = 6)
Aldrin	0,411	89,1	1,0 (n = 4)
	0,822	74,3	5,8 (n = 6)
Heptacloro epóxido	0,440	107	1,1 (n = 4)
	0,880	72,6	5,5 (n = 4)
Dieldrin	0,428	71,4	12 (n = 4)
	0,856	69,7	12 (n = 6)
4,4'-DDE	0,501	107	3,1 (n = 4)
	0,799	84,3	7,8 (n = 6)
Endrin	0,401	120	2,1 (n = 4)
	1,20	90,0	5,6 (n = 6)
4,4'-DDT	0,450	118	1,0 (n = 4)
	0,900	108	9,0 (n = 6)

Legenda: RSD = estimativa do desvio padrão relativo.

Os valores das recuperações dos OCP em folhas de guaco encontram-se na faixa entre 70 a 120% e os resultados da precisão foram satisfatórios, com um valor máximo de 12 %.

Tabela V.5 Ensaio de recuperação (exatidão) para a amostra de espinheira santa.

OCP	Fortificações (ng g ⁻¹)	Recuperações médias (%)	RSD (%) n = 3
Hexaclorobenzeno	20	74	14
	40	97	1,0
	210	113	4,2
Lindano	20	79	7,0
	50	99	11
	250	110	4,8
Heptacloro	20	87	8,3
	40	105	2,4
	200	105	2,7
Aldrin	20	86	15
	50	106	2,9
	260	115	4,0
Heptacloro epóxido	20	99	9,5
	50	96	3,2
	240	125	6,4
Dieldrin	20	89	13
	50	103	5,7
	200	96	4,9
4,4'-DDE	20	88	8,4
	40	91	3,5
	220	99	4,6
Endrin	20	89	9,2
	40	95	2,8
	200	106	5,1
4,4'-DDT	20	78	7,7
	40	124	5,2
	220	101	5,2

Os valores obtidos com o ensaio de recuperação foram satisfatórios, confirmando os resultados obtidos com a amostra de guaco. Para as amostras de erva baleeira, as recuperações estão apresentadas na Tabela V.6.

Tabela V.6 Ensaio de recuperação (exatidão) para a amostra de erva baleeira.

OCP	Fortificações (ng g ⁻¹)	Recuperações médias (%)	RSD (%) n = 3
Hexaclorobenzeno	20	69	9,3
	210	93	5,1
Lindano	20	88	10
	250	83	6,4
Heptacloro	20	104	12
	200	77	4,8
Aldrin	20	71	11
	260	66	4,8
Heptacloro epóxido	20	111	8,8
	240	75	7,3
Dieldrin	20	85	9,9
	200	97	5,2
4,4'-DDE	20	79	9,2
	220	92	5,4
Endrin	20	100	7,5
	200	97	4,8
4,4'-DDT	20	74	9,0
	220	90	6,5

Os resultados do teste de recuperação para as amostras de espinheira santa, guaco e erva baleeira apresentaram valores satisfatórios, em vista disso, foi realizada a dosagem de OCP nas plantas em estudo.

A Figura V.5 apresenta os cromatogramas da amostra de espinheira santa proveniente do cultivo em Paulínia (A) e da mesma amostra fortificada com a mistura de padrões de OCP (B).

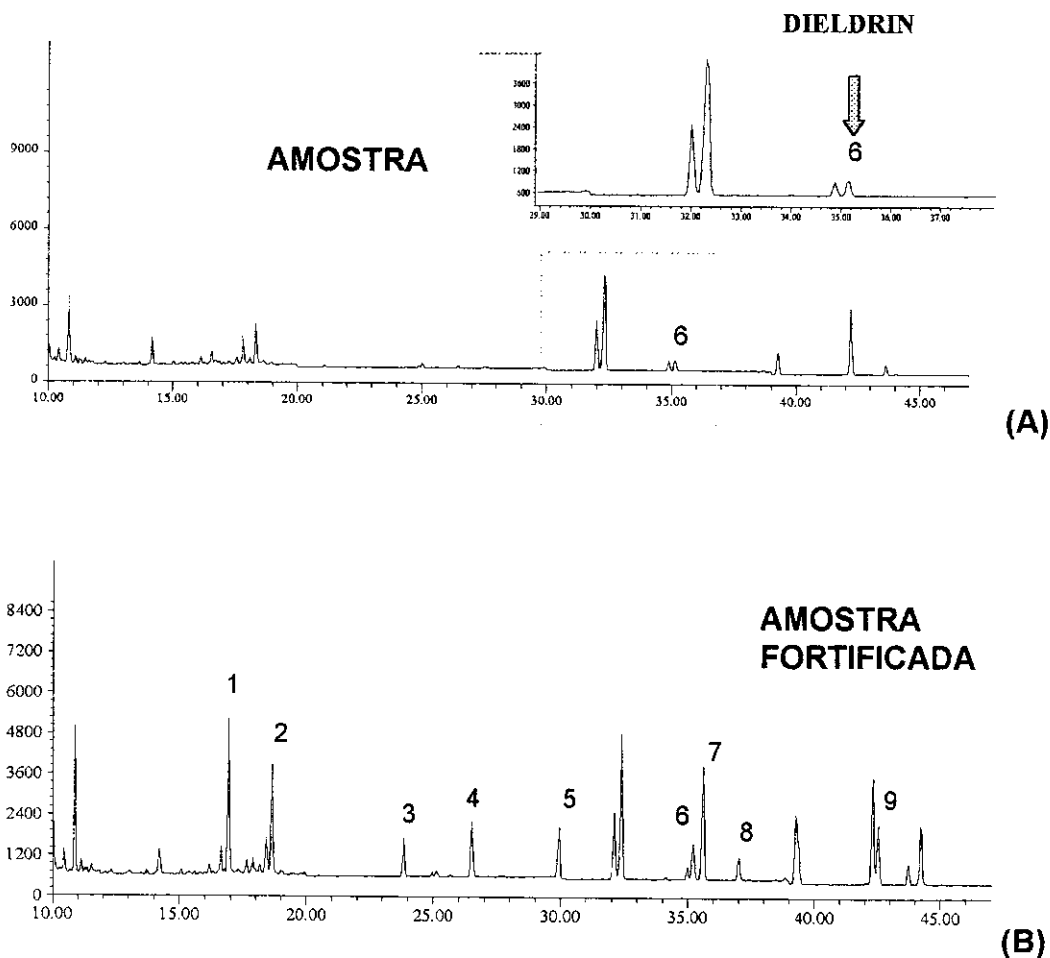


Figura V.5 Cromatogramas total de íons obtidos por GC-MS (SIM) da amostra de espinheira santa proveniente do Campo Experimental de Paulínia (A) com janela expandida mostrando a contaminação por dieltrin em (B) a mesma amostra de espinheira santa fortificada com os OCP. Os picos apresentados correspondem aos seguintes compostos: (1) hexaclorobenzeno; (2) lindano; (3) heptacloro; (4) aldrin; (5) heptacloro epóxido; (6) dieltrin; (7) 4,4' – DDE; (8) endrin e (9) 4,4' – DDT. Condições cromatográficas já descritas no texto.

Nos cromatogramas da Figura V.5 verifica-se a contaminação por dieldrin da amostra de espinheira santa proveniente do cultivo em Paulínia (cromatograma A) e o cromatograma da mesma amostra fortificada com os 9 padrões de pesticidas (cromatograma B). A confirmação da identidade do pico de dieldrin se deu através do monitoramento dos íons selecionados para o dieldrin, ou seja, o m/z 263 utilizado para quantificação (IQ), o m/z 237 e o m/z 345 utilizados como íons de identificação (Figura V.6).

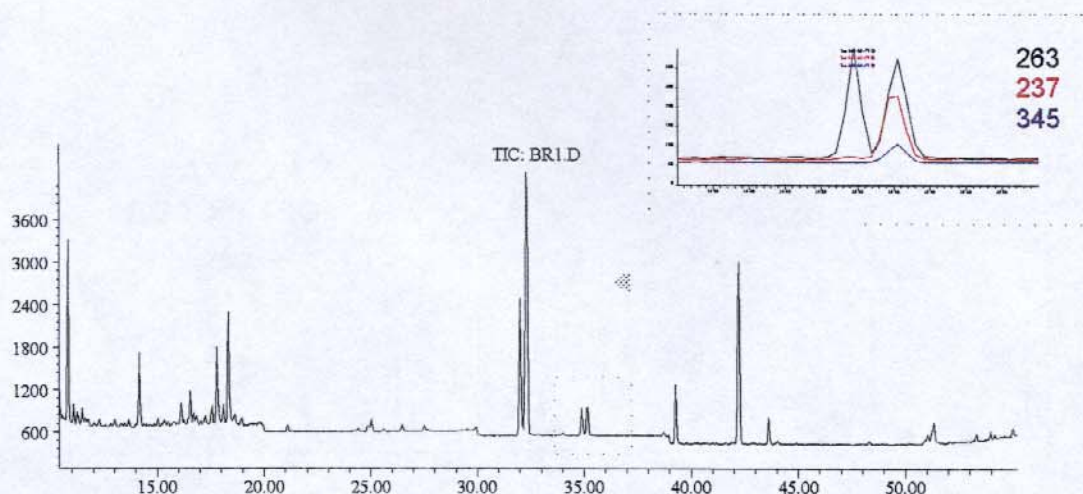


Figura V.6 Cromatograma obtido por GC-MS no modo SIM da amostra de espinheira santa proveniente do Campo Experimental de Paulínia, com janela mostrando o pico de dieldrin (à direita) e a confirmação de sua identidade pelos fragmentos m/z 263, 237 e 345. Condições cromatográficas já descritas no texto.

Dessa forma, a utilização do GC-MS permitiu confirmar a presença do dieldrin na amostra analisada (Figura V.6) e a metodologia de extração avaliada apresentou resultados satisfatórios para a quantificação dos OCP nas plantas em estudo (folhas).

V.6.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO UTILIZANDO A TÉCNICA DE MAE

A avaliação da técnica de MAE foi realizada através da análise dos ensaios por SPME-GC-MS, por isso, estão apresentados primeiramente as condições otimizadas de uso da fibra de PDMS sob imersão.

V.6.2.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS DA SPME

O desenvolvimento de um procedimento para determinação de pesticidas usando a técnica de SPME, normalmente requer a otimização das variáveis das fases de extração e desorção.

Nesse estudo, a otimização das condições operacionais do SPME para análise dos OCP, foi realizada através de um planejamento fatorial 2^2 completo, com 3 repetições do ponto central, onde as variáveis estudadas foram o tempo de exposição da fibra e a temperatura do banho.

A temperatura de dessorção da fibra, foi mantida a 270°C. Esta temperatura mais elevada é requerida devido a alta afinidade dos OCP para a fibra PDMS, necessária para transferir os analitos extraídos na fibra para dentro da coluna cromatográfica (CHEE *et al.*, 1999).

Já o tempo de dessorção da fibra foi mantido em 5 min, pois ensaios preliminares demonstraram não haver compostos remanescentes após a injeção de padrões (efeito de memória).

A adição de sal (cloreto de sódio) para aumentar a força iônica da solução amostra, também foi avaliada e não teve efeito significativo na resposta, portanto não foi utilizada. As respostas obtidas para os 9 pesticidas nos ensaios do planejamento experimental, em termos da massa (ng) de pesticida recuperado, estão apresentadas na Tabela V.7.

Tabela V.7 Respostas em massa recuperada (ng) dos OCP, obtidos no planejamento composto central 2² para otimização das condições de operação da fibra de PDMS.

Ensaio	Massa de pesticidas recuperada (ng)								
	Hexaclorobenzeno	Lindano	Heptacloro	Aldrin	Heptacloro epóxido	Dieldrin	4,4'-DDE	Endrin	4,4'-DDT
01	1,33	0,610	1,18	0,58	1,81	1,46	0,903	1,72	0,759
02	1,61	0,368	1,09	0,68	1,97	1,70	1,37	1,84	0,977
03	3,88	0,660	3,93	1,53	4,56	3,84	1,75	2,80	1,14
04	2,38	0,403	1,94	1,88	3,96	4,66	3,59	3,25	3,02
05	0,602	0,304	0,681	0,27	0,629	0,530	0,601	1,30	0,175
06	4,01	0,970	5,19	2,75	6,32	6,19	4,71	4,83	2,26
07	3,12	0,741	2,95	1,42	3,81	3,08	1,80	2,92	0,869
08	1,71	0,290	0,788	1,01	3,25	3,71	2,99	2,78	2,41
09	3,20	0,482	3,50	1,64	4,48	4,11	3,06	3,44	2,14
10	3,61	0,469	3,72	2,03	4,78	4,37	3,68	3,43	1,88
11	3,42	0,491	3,66	1,69	4,96	4,44	3,11	3,69	1,67
ng adicionado	26,0	25,2	31,5	24,3	24,3	25,7	28,4	26,1	28,1

Verifica-se na Tabela V.7 que o ensaio 06 (extração em 105 min a 50 °C, ver Tabela V.2) foi o que apresentou a melhor resposta em termos de recuperação para a maioria dos compostos em estudo, excetuando-se o 4,4'-DDT, que apresentou melhor resposta no ensaio 04 (extração em 90 min a 70 °C). As Figuras V.7 - 11. apresentam as superfícies de resposta geradas para os OCP.

HEXACLORO BENZENO

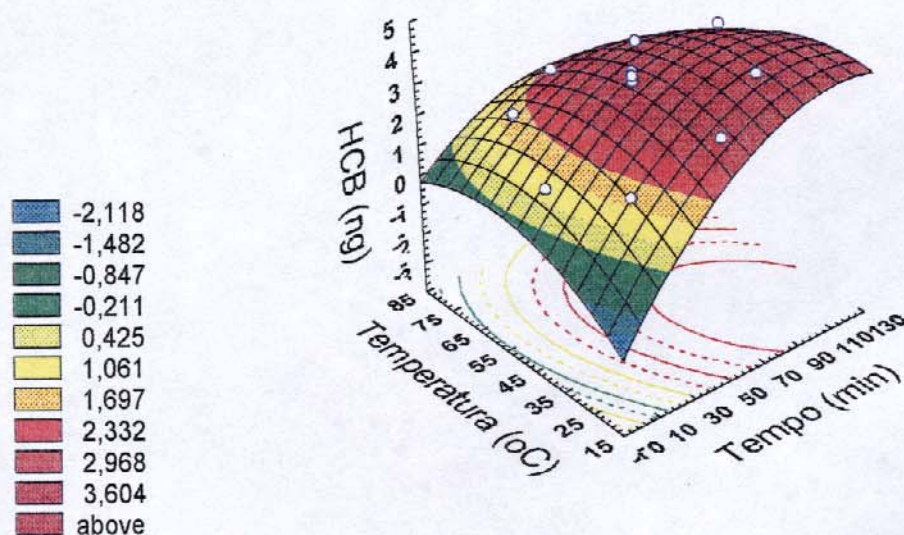
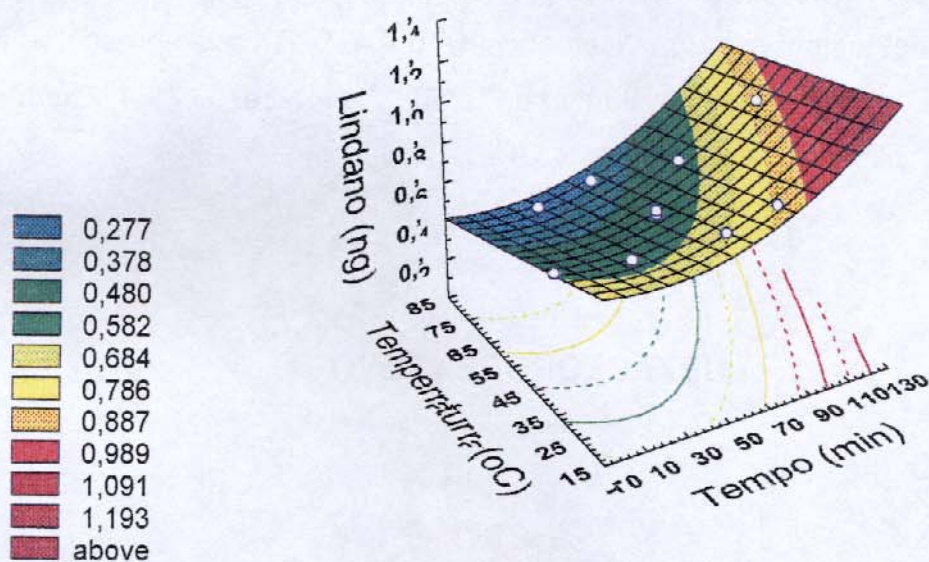


Figura V.7 Superfície de resposta obtida para o hexaclorobenzeno na otimização das condições operacionais da SPME.

LINDANO



HEPTACLORO

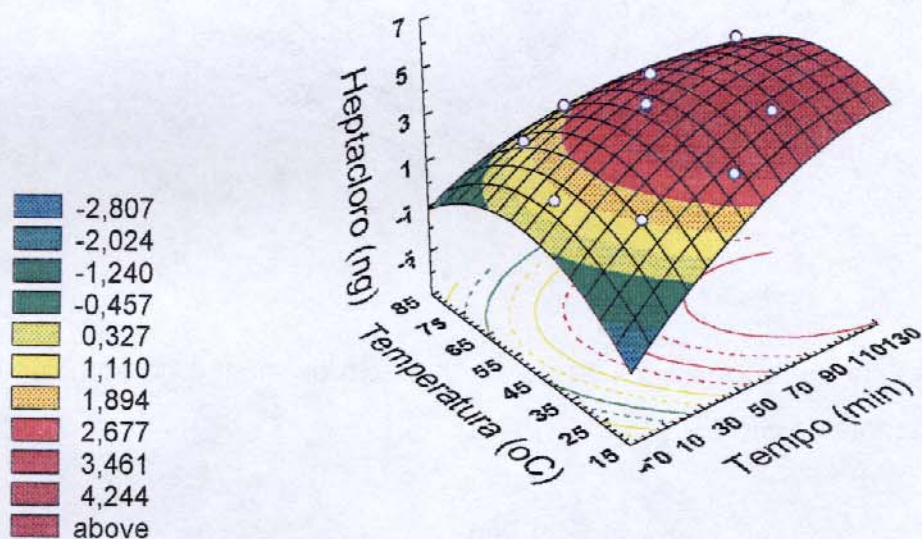
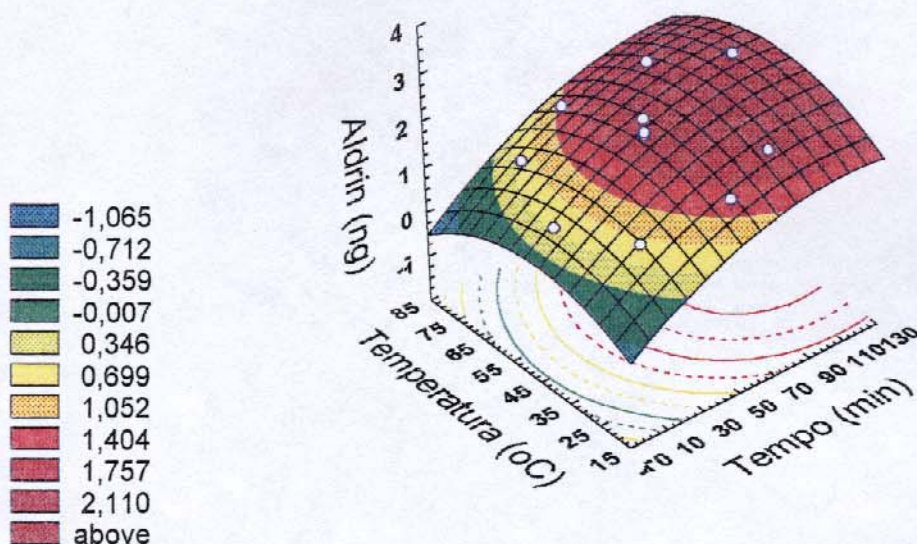


Figura V.8 Superfícies de resposta obtidas para o lindano e heptacloro na otimização das condições operacionais da SPME.

ALDRIN



HEPTACLORO EPÓXIDO

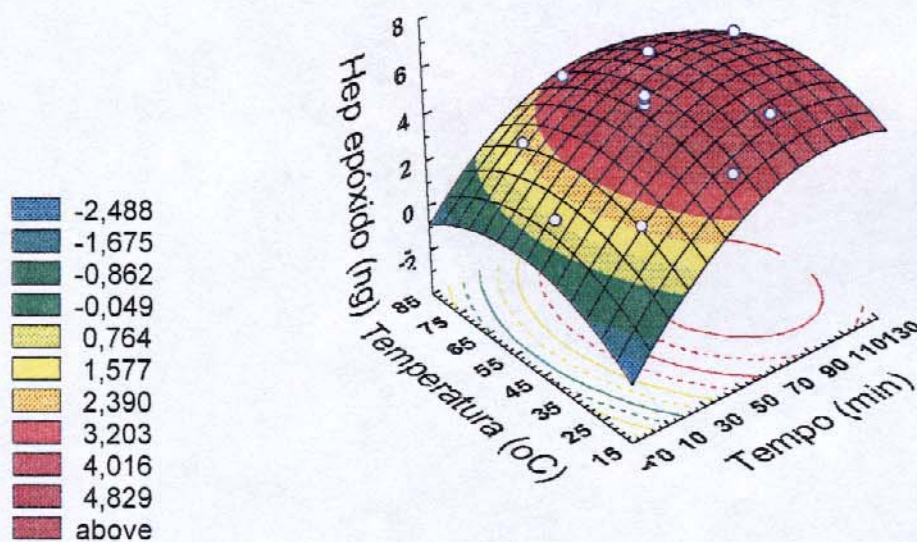
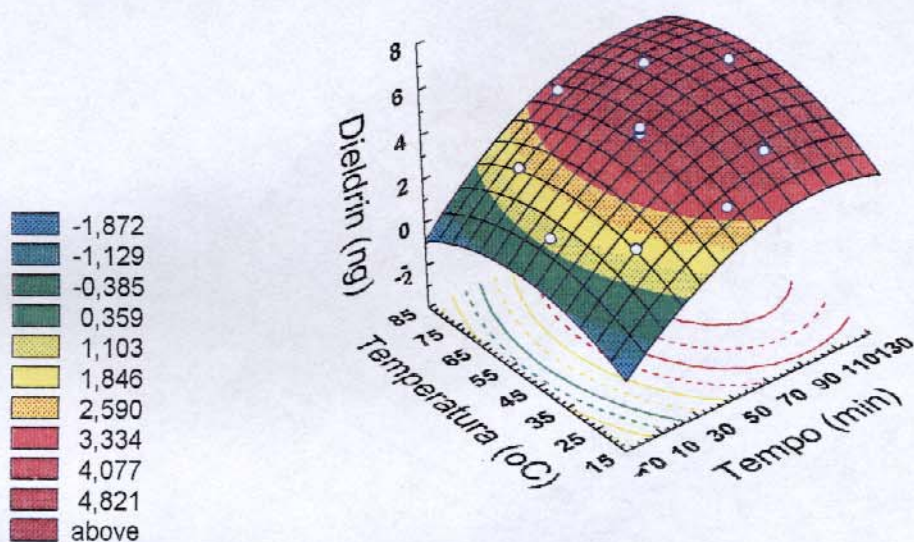


Figura V.9 Superfícies de resposta obtidas para o aldrin e heptacloro epóxido na otimização das condições operacionais da SPME.

DIELDRIN



4,4'-DDE

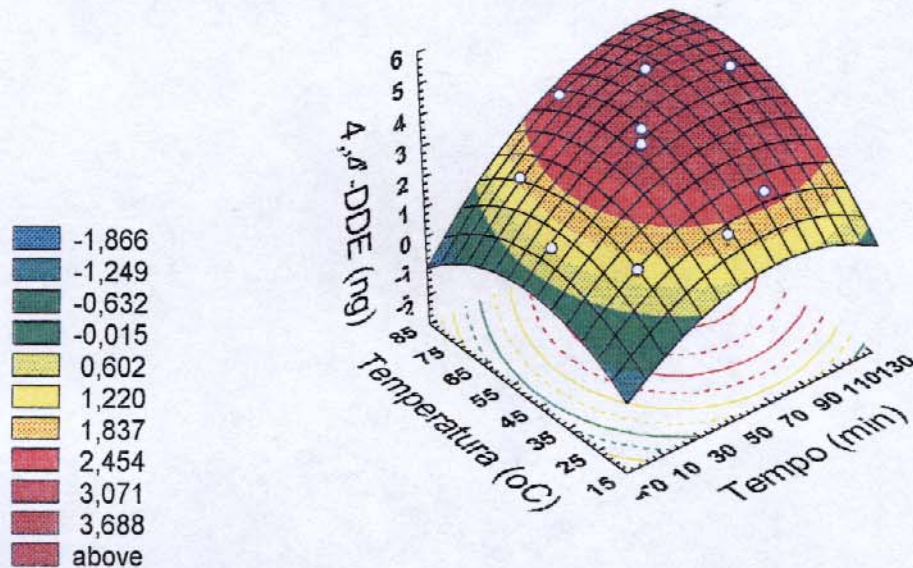
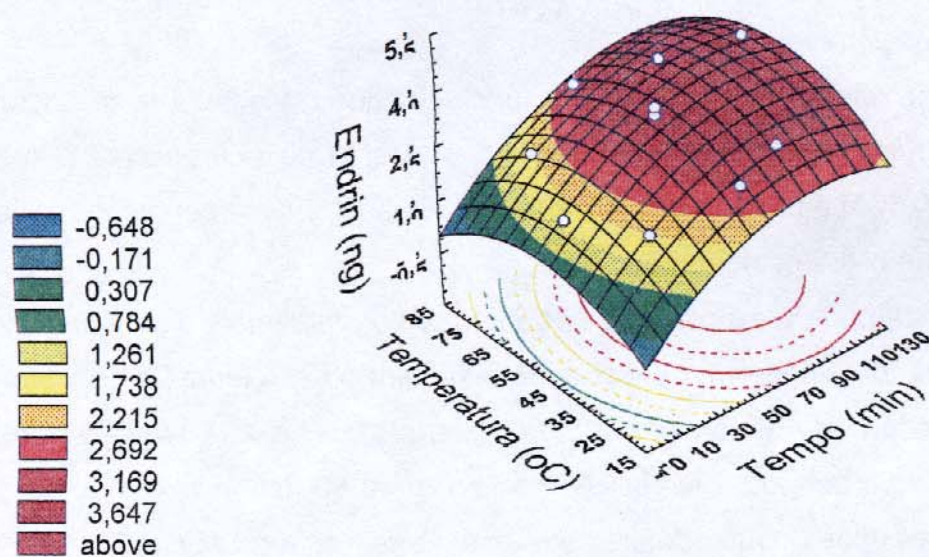


Figura V.10 Superfícies de resposta obtidas para o dieldrin e o 4,4'-DDE na otimização das condições operacionais da SPME.

ENDRIN



4,4'- DDT

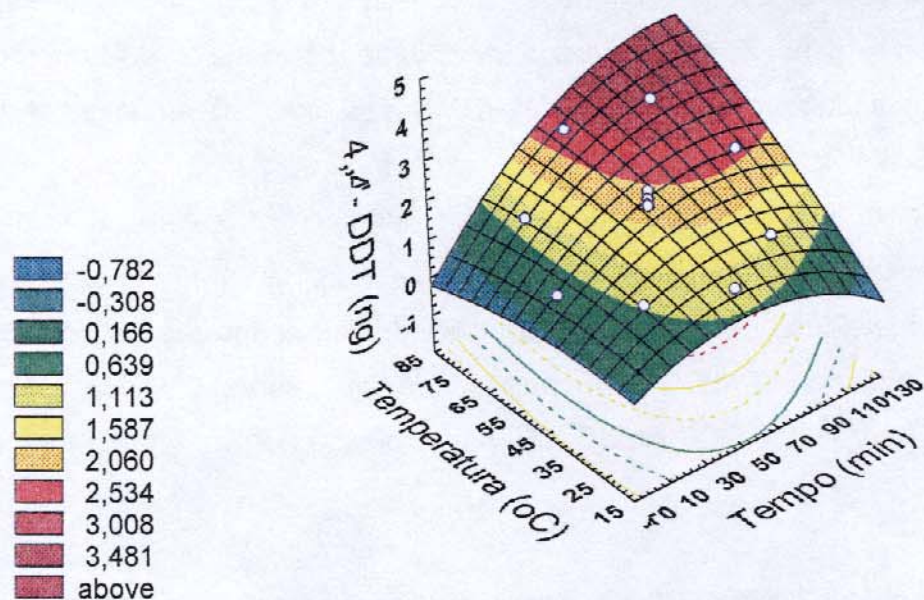


Figura V.11 Superfícies de resposta obtidas para o endrin e o 4,4'-DDT na otimização das condições operacionais da SPME.

O modelo que melhor representou os dados experimentais foi o modelo quadrático. As tabelas de análise de variância (ANOVA) para os modelos testados para cada um dos 9 OCP estão detalhadas no Anexo B (p.136-145), assim como as tabelas com os efeitos das variáveis.

Pela análise das superfícies geradas conclui-se que a tendência geral para todos os OCP é um tempo de exposição elevado, o que está de acordo com o artigo de HWANG & LEE (2000) e temperatura de extração a 50 °C. Essas condições satisfazem a maioria dos compostos estudados.

Porém, um tempo de exposição de 105 min prolonga demais o tempo de análise, por isso foi necessário estabelecer um compromisso entre esse tempo de exposição da fibra e a quantidade de OCP recuperada, de modo a tornar a análise viável. Por este motivo, foi reduzido o tempo de exposição da fibra para 60 min, o que, embora leve a uma menor sensibilidade do método, permite uma maior frequência analítica.

As superfícies também indicaram que os experimentos atingiram a faixa otimizada, com exceção do lindano que necessita de tempo de exposição superior a 130 min para aumentar a resposta, o que estenderia muito o tempo de análise. Esse comportamento do lindano já era esperado devido ao baixo valor da constante de distribuição (k) do lindano entre a fase de PDMS e a solução amostra, verificado também por WU & SWOO (2001).

A porcentagem de recuperação dos analitos nas condições otimizadas da fibra, (50 °C durante 60 min) variou entre 4% e 24%, para o lindano e dieldrin, respectivamente, considerando a quantidade inicial destes pesticidas adicionados em água e quantificados por SPME-GC-MS através de uma curva analítica obtida por injeção direta dos padrões de OCP no GC-MS (sem utilizar a fibra).

V.6.2.2 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICROONDAS (MAE)

Esse sistema difere dos métodos clássicos de extração com solvente, onde o solvente migra para dentro da matriz e extrai os compostos por solubilização. Na MAE

uma grande variedade de solventes pode ser utilizada, uma vez que a extração não depende da afinidade do analito pelo solvente de extração, como no caso em questão onde se utilizou água como solvente extrator para analitos lipofílicos (OCP).

Na extração dos pesticidas das plantas medicinais, o solvente a ser usado será apenas água, o que constitui uma grande vantagem, pois isso permite a imersão direta da fibra de PDMS e concomitante análise por GC-MS, onde as condições já foram previamente estabelecidas.

A utilização da técnica hifenada MAE-SPME-GC-MS, a princípio parece ser bastante vantajosa, pois associa a extração por microondas utilizando água como solvente de extração, seleciona os analitos de interesse através da imersão da fibra de PDMS na solução de extração que é introduzida diretamente no cromatógrafo à gás com detetor seletivo de massas, fazendo a quantificação e identificação dos pesticidas simultaneamente.

A otimização das condições operacionais para a extração assistida por microondas dos OCP, foi feita através de um planejamento experimental composto central 2^2 com triplicata do ponto central, totalizando 11 ensaios e utilizando como amostra, o guaco fortificado na faixa entre 23,8 a 31,2 ng g⁻¹.

Após submetidas às condições de cada um dos ensaios, os extratos foram filtrados em funil de placa porosa e avolumados para 25 mL com água e retirada uma alíquota para análise por microextração em fase sólida nas condições já estabelecidas anteriormente.

Visualmente, foi possível notar a alta eficiência de extração do microondas, através da coloração intensa dos extratos. Porém essa alta capacidade extrativa, prejudicou a subsequente análise, por SPME, aumentando o número de interferentes e dificultando a detecção dos OCP por GC-MS, devido à acentuada queda na sensibilidade do método.

A utilização de amostra fortificada se deu devido à falta de amostra certificada, porém essa situação não retrata a real disponibilidade do pesticida na planta.

Ficou evidente que a falta de seletividade da fibra de PDMS e a alta capacidade extrativa do microondas inviabilizaram a análise por MAE-SPME-GC-MS. Também foi

testada a partição com hexano do extrato obtido por microondas, mas o resultado foi uma emulsão persistente.

A utilização de cartuchos de C-18 para limpeza dos extratos obtidos nos ensaios por MAE, também foi testada, porém houve saturação dos cartuchos (contendo 1 g de fase C-18) devido ao grande número de compostos extraídos da matriz. Os testes foram interrompidos, porque o uso da extração em fase sólida associada ao MAE não traria vantagens sobre o método convencional de análise de resíduos de pesticidas, pois desviaria do objetivo central do uso do microondas, que era de simplificar a análise e evitar o uso de grandes quantidades de solventes.

Esse mesmo procedimento descrito por WU & SWOO (2001) mostrou resultados satisfatórios por ter sido utilizada outro tipo de matriz, ou seja, raízes ao invés de folhas, portanto com interferentes totalmente distintos. Dessa forma, os ensaios obtidos por MAE foram descartados e escolhida a metodologia de extração por solvente e limpeza por SPE (avaliada no item V.6.1) para a quantificação dos OCP nas plantas em estudo.

V.6.3 ANÁLISE DAS PLANTAS PROVENIENTES DE PAULÍNIA

Em vista de toda a problemática ambiental da região de Paulínia-SP, já discutida no capítulo III, bem como do incidente envolvendo o complexo industrial Shell-Paulínia, a análise de algumas espécies perenes de plantas medicinais cultivadas no Campo Experimental de Paulínia foi realizada no intuito de avaliar a presença de OCP nestas plantas como consequência dos elevados índices de poluição da região.

A dosagem dos OCP nas plantas cultivadas no Campo Experimental de Paulínia está apresentada na Tabela V.8.

Tabela V.8 Quantificação dos OCP nas plantas cultivadas em Paulínia-SP.

Pesticidas	Teor médio (ng g ⁻¹), n = 3		
	Guaco	Espinheira-Santa	Erva baleeira
Hexaclorobenzeno	< 5,0	< 5,0	< 5,0
Lindano	nd ^a	nd ^a	nd ^a
Heptacloro	nd ^b	nd ^b	nd ^b
Aldrin	nd ^c	nd ^c	nd ^c
Heptacloro epóxido	nd ^d	nd ^d	nd ^d
Dieldrin	110	72	100
4,4' - DDE	< 2,0	nd ^e	< 2,0
Endrin	nd ^f	nd ^f	nd ^f
4,4' - DDT	nd ^g	nd ^g	nd ^g

Legenda: nd = não detectado; (^a) < 7,0 ng g⁻¹; (^b) < 2,0 ng g⁻¹; (^c) < 1,0 ng g⁻¹; (^d) < 2,0 ng g⁻¹; (^e) < 0,5 ng g⁻¹; (^f) < 9,0 ng g⁻¹; (^g) < 0,8 ng g⁻¹.

Pelos resultados apresentados na Tabela V.8 das plantas provenientes do cultivo em Paulínia-SP, verifica-se que dos 9 pesticidas analisados, 6 deles não foram detectados em nenhuma das 3 espécies vegetais analisadas. São eles: lindano, heptacloro, heptacloro epóxido, aldrin, endrin e 4,4'-DDT.

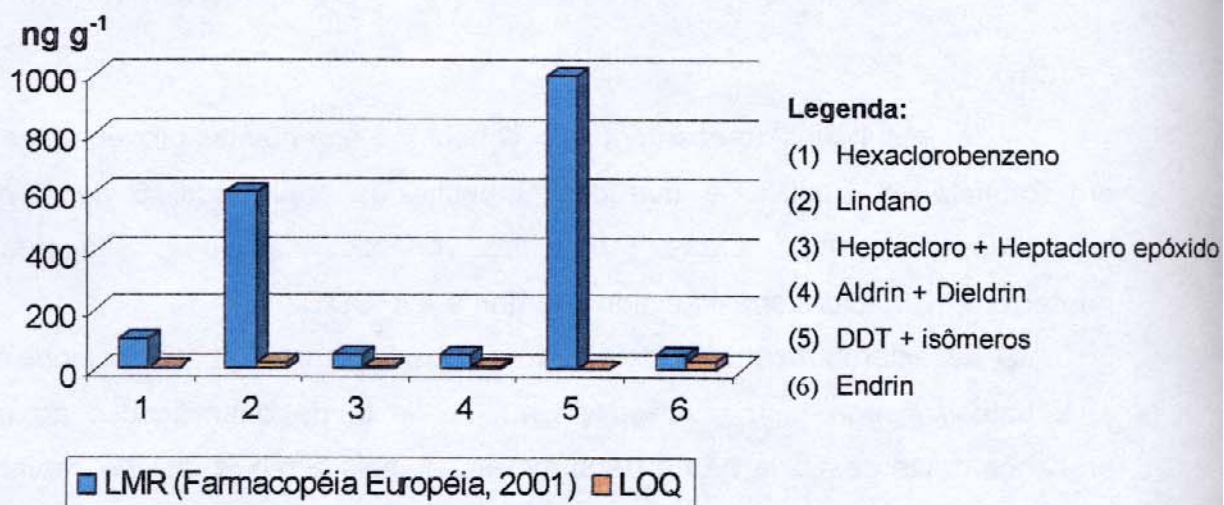
O hexaclorobenzeno foi detectado nestas 3 plantas (guaco, espinheira santa e erva baleeira), porém, a níveis inferiores ao limite de quantificação do método. A presença deste pesticida não é de surpreender, pois como já dito no capítulo I, ele é considerado o pesticida mais distribuído no planeta devido à sua alta persistência e volatilidade (TURNBULL, 1996). O importante é que seus níveis não ultrapassem aos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos na Farmacopéia, que no caso é de 100 ng g⁻¹ (Tabela V.9).

Outro OCP detectado foi o 4,4'-DDE encontrado nas amostras de guaco e erva baleeira, porém a níveis inferiores ao limite de quantificação.

Significantes foram os níveis encontrados para dieldrin nas 3 amostras provenientes do Campo Experimental de Paulínia, que foram de 110 ng g^{-1} , 70 ng g^{-1} e 100 ng g^{-1} para o guaco, espinheira santa e erva baleeira, respectivamente. Estes níveis encontram-se acima do limite máximo tolerado expresso na Farmacopéia européia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2001), a qual estabelece um valor máximo de 50 ng g^{-1} para a soma de dieldrin e aldrin (Tabela V.9).

Contudo, nota-se uma certa concordância entre os valores obtidos para os OCP nas 3 amostras de Paulínia, apontando para uma problemática ambiental.

O método utilizado para a quantificação dos OCP nas plantas (folhas de guaco, espinheira santa e erva baleeira) apresenta sensibilidade adequada em relação aos LMR estabelecidos na Farmacopéia Européia. A Figura V.12 apresenta de forma esquemática a dimensão da diferença entre o limite de quantificação do método empregado e os LMR recomendados pela Farmacopéia Européia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2001).



Fonte: EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2001.

Figura V.12 Comparação entre os valores (ng g^{-1}) dos limites máximos de resíduo recomendados pela Farmacopéia Européia e os limites de quantificação para os OCP em estudo.

Pela Figura V.12 fica evidente que o método utilizado para a quantificação dos OCP em plantas medicinais (folhas) apresenta sensibilidade adequada em relação aos limites máximos de resíduos recomendados pela Farmacopéia Européia.

V.6.4 ANÁLISE DAS PLANTAS DE DIFERENTES FORNECEDORES COMERCIAIS

A Tabela V.10 apresenta os teores dos OCP encontrados para as amostras de guaco de diferentes procedências, ou seja, a amostra cultivada em Paulínia-SP, a amostra proveniente da distribuidora de plantas medicinais de São Paulo-SP e a amostra obtida junto à farmácia de manipulação em Jundiaí-SP.

Os resultados obtidos com o guaco cultivado em Paulínia já foram apresentados anteriormente, mas para fins de comparação foram repetidos na Tabela V.9.

Tabela V.9 Análise dos OCP em folhas de guaco de diferentes procedências.

Pesticidas	Teor médio (ng g ⁻¹) em amostras de guaco de diferentes origens, n = 3.		
	Paulínia-SP	Distribuidora	Farmácia
Hexaclorobenzeno	< 5,0	< 5,0	< 5,0
Lindano	nd ^a	nd ^a	nd ^a
Heptacloro	nd ^b	nd ^b	nd ^b
Aldrin	nd ^c	nd ^c	nd ^c
Heptacloro epóxido	nd ^d	nd ^d	nd ^d
Dieldrin	110	22	nd ^e
4,4'-DDE	< 2,0	2,0	nd ^f
Endrin	nd ^g	nd ^g	nd ^g
4,4'-DDT	nd ^h	nd ^h	nd ^h

Legenda: nd = não detectado; (^a) < 7,0 ng g⁻¹; (^b) < 2,0 ng g⁻¹; (^c) < 1,0 ng g⁻¹; (^d) < 2,0 ng g⁻¹; (^e) < 3,0 ng g⁻¹; (^f) < 0,5 ng g⁻¹; (^g) < 9,0 ng g⁻¹; (^h) < 0,8 ng g⁻¹.

Os resultados obtidos com essas três amostras de guaco diferem significativamente no teor de dieldrin, onde a amostra do Campo Experimental de Paulínia apresentou um valor cerca de cinco vezes superior à amostra proveniente da distribuidora de plantas medicinais, sendo que na amostra adquirida junto à farmácia de manipulação, não foi detectado este composto.

O hexaclorobenzeno foi detectado nas três amostras de guaco, porém a níveis inferiores ao limite de quantificação do método e, conseqüentemente, inferior ao LMR estabelecido. O 4,4'-DDE foi detectado nas amostras de guaco provenientes de Paulínia e da distribuidora de plantas medicinais, porém, a níveis inferior e igual ao limite de quantificação do método, respectivamente.

Os resultados obtidos com a análise do guaco confirmaram a contaminação por dieldrin nas plantas cultivadas em Paulínia. As amostras adquiridas junto ao comércio não apresentaram problema quanto aos níveis de OCP encontrados.

V.7 CONCLUSÕES

O método utilizado para a quantificação dos OCP nas plantas (folhas) em estudo mostrou sensibilidade adequada de acordo com os LMR recomendados pela Farmacopéia Européia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2001).

Os níveis de dieldrin encontrados nas amostras provenientes do cultivo em Paulínia estão acima do LMR estabelecido pela Farmacopéia Européia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2001), o que pode ser decorrente da poluição da região, uma vez que estes pesticidas não foram aplicados no Campo Experimental, de acordo com informações obtidas sobre o local.

Pelo vasto histórico de contaminação de Paulínia, principalmente pelos acontecimentos envolvendo pesticidas organoclorados ("drins") no antigo complexo industrial Shell - Paulínia, localizado a cerca de 15 km do campo de cultivo destas plantas (foto por satélite no ANEXO A, p. 135), é possível que essa contaminação seja

decorrente da água de irrigação, que no Campo Experimental de Paulínia é realizada a partir de poços artesianos.

CAPÍTULO VI – DETERMINAÇÃO DE OCP EM INFUSÕES E ESTUDO DA TAXA DE TRANSFERÊNCIA

VI.1 INTRODUÇÃO

Dentre as plantas selecionadas para este estudo, o guaco e a espinheira santa são as mais utilizadas na forma de infusão pela população em geral. O guaco para distúrbios respiratórios e a espinheira santa para problemas estomacais.

O processamento de plantas medicinais para produção de fitoterápicos pode alterar a concentração dos possíveis contaminantes presentes na planta, por isso, alguns autores consideram mais importante os níveis de resíduos na preparação final do que na planta em si e a concentração presente na infusão depende basicamente da solubilidade do pesticida em água. A influência de degradação química durante a infusão não parece ser significativa (ZUIN & VILEGAS, 2000).

Segundo a literatura, uma alta taxa de transferência dos OCP é observada no preparo de extratos alcoólicos, já para os extratos aquosos essa taxa é bem inferior. No caso de tinturas a quantidade transferida chega a 90%, para extratos secos 60%, para infusões 25% e decocções apenas 14%, entretanto, essas taxas não minimizam o perigo da ingestão destes compostos altamente tóxicos por pessoas com o estado físico debilitado (ZUIN & VILEGAS, 2000).

A presença de resíduos de OCP em plantas é muito comum, visto a persistência ambiental destes compostos, porém, sua detectabilidade em infusões nem sempre é possível, visto a baixa solubilidade destes compostos em água. ALI (1987, apud SIMÕES *et al.*, 2000, p. 215) determinou o teor de OCP em 45 lotes de 14 espécies de plantas e demonstrou que a taxa de transferência destes pesticidas da planta para a infusão variou de 3 a 67% do teor encontrado na matéria-prima. BLUMENTHAL & CERNY (1976) afirmaram que menos de 6% dos OCP presentes na planta é transferido para a bebida durante o preparo da infusão.

VI.2 OBJETIVOS

Os objetivos deste capítulo foram estabelecer um método analítico para dosagem dos OCP em infusões de guaco (folhas fortificadas), utilizando a técnica hifenada SPME-GC-MS a partir das condições já otimizadas de operação do SPME apresentadas no capítulo V e determinar a taxa de transferência dos pesticidas presentes na folha para a infusão. Para tanto, o método foi devidamente validado e aplicado para a dosagem dos OCP em infusões de guaco e espinheira santa. Para facilitar o estudo da taxa de transferência dos pesticidas da folha para a infusão e trabalhar dentro dos limites de quantificação do método, foi realizada a fortificação das folhas de guaco antes da obtenção da infusão de guaco.

VI.3 EXPERIMENTAL

VI.3.1 MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas folhas secas de guaco (*Mikania laevigata*) e espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*) provenientes do cultivo em Paulínia, devidamente processadas em moinho de facas na presença de gelo seco e armazenadas em freezer até o momento da análise.

VI.3.2 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS

Foi preparada uma solução estoque de OCP contendo cerca de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada composto em hexano grau pesticida (Tedia, Fairfield, OH, USA). Os padrões de pesticidas utilizados foram: hexaclorobenzeno 99 %, lindano 98,9 %, heptacloro 99,5%, heptacloro

epóxido (isômero B) 99,5 %, aldrin 98,5 %, dieldrin 98,9 %, endrin 99,0 %, 4,4'-DDE 99,3 % e 4,4'-DDT 98,8 % de pureza, adquiridos da Chem Service (West Chester, PA, USA).

Os experimentos de SPME utilizaram a fibra de PDMS 100 μm acoplada no "holder" (Supelco, Bellefonte, PA, USA) sob imersão direta na infusão para extração dos OCP.

VI.3.3 MATERIAL PARA SPME

- "Holder" para SPME (Supelco, Bellefonte, PA, EUA)
- Fibras de PDMS 100 μm (Supelco, Bellefonte, PA, EUA)
- Frascos de vidro com 38 mL de capacidade e boca de 20 mm
- Lacs de alumínio de 20 mm de diâmetro
- Septos de teflon/silicone (Pierce, Rockford, IL, EUA)
- Lacrador para frascos com 20 mm de diâmetro (Merse, Campinas, SP, Brasil)

VI.3.4 INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As análises foram realizadas num GC-MS da marca Hewlett-Packard modelo 5890 Series II (Palo Alto, CA, EUA) equipado com um detetor seletivo de massas HP 5971 operando no modo SIM. As separações cromatográficas foram realizadas numa coluna capilar HP-5MS (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, EUA) de 30 m x 0,25 mm e 0,25 μm de filme. O sistema cromatográfico foi operado no modo "splitless" com o injetor a 270 °C. Como gás de arraste foi utilizado hélio a 1 mL min⁻¹. A programação de temperatura do forno utilizada foi: 90 °C durante 1 min, 12 °C min⁻¹ até 150 °C durante 1 min, 2 °C min⁻¹ até 230 °C por 3 min, 10 °C min⁻¹ até 275 °C durante 25 min.

A tabela SIM para a quantificação dos OCP em estudo está descrita no capítulo IV.

VI.4 PROCEDIMENTOS

VI.4.1 PREPARO DAS INFUSÕES

As infusões de guaco e de espinheira santa foram preparadas a partir de 20 g da planta seca e moída em 1 L de água fervente, sob agitação magnética e abafamento por 1 h (CHERNOVIZ, 1996).

Depois de atingir a temperatura ambiente, o infuso foi filtrado sob funil de placa sinterizada e analisado por SPME-GC-MS.

VI.4.2 FORTIFICAÇÃO DO GUACO PARA AVALIAR A TAXA DE TRANSFERÊNCIA

A fortificação das folhas de guaco foi realizada através da adição de 500 μL de uma mistura padrão de OCP em hexano em 20 g de folhas de guaco. Essa amostra fortificada foi armazenada durante 1 semana antes da obtenção da infusão em temperatura ambiente para evaporação do solvente. Os níveis de fortificações obtidas estão apresentados na Tabela VI.1.

Tabela VI.1 Fortificações nas folhas de guaco.

OCP	Solução usada para fortificar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Fortificação ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Hexaclorobenzeno	434	10,9
Lindano	479	12,0
Heptacloro	398	10,0
Aldrin	520	13,0
Heptacloro epóxido	476	11,9
Dieldrin	407	10,2
4,4' - DDE	445	11,1
Endrin	404	10,1
4,4' - DDT	444	11,1

VI.4.3 PROCEDIMENTO ANALÍTICO

Alíquotas de 25 mL da infusão foram transferidas para frascos de 38 mL de capacidade. Diluições apropriadas dos padrões de OCP foram obtidas de modo a adicionar quantidades equivalentes a 20, 40, 65, 85 e 100 ng de cada pesticida. Estes frascos foram selados e submetidos à análise por SPME nas condições previamente otimizadas (capítulo IV), ou seja, banho de 50 °C durante 60 min, utilizando a fibra de PDMS sob imersão. Cada amostra foi agitada vigorosamente em placa de agitação magnética. Depois da extração, a fibra foi diretamente exposta no injetor do cromatógrafo a 270 °C para a dessorção térmica dos analitos durante 5 min.

Cada ponto da curva de adição de padrão (0, 20, 40, 65, 85 e 100 ng de OCP) foi feito em triplicata para ser submetido à análise por SPME-GC-MS.

VI.5 RESULTADOS

Antes de iniciar os ensaios com amostras e padrões, a fibra de PDMS foi condicionada conforme instruções do fabricante (250 °C durante 30 min) e feito um branco da fibra, através de sua exposição direta no injetor do cromatógrafo a 270 °C para verificar possíveis interferências da fase líquida da fibra.

A água utilizada na produção da infusão também foi amostrada, a fim de certificar da ausência de contaminação da mesma e atribuir à planta qualquer eventual resíduo de pesticida encontrado. Para isto, foram realizadas triplicatas de extração da água e seqüencial análise das infusões.

Os resultados obtidos com o branco da fibra não indicaram a presença de interferentes com os pesticidas analisados durante a análise cromatográfica.

Quanto à análise da água utilizada no preparo das infusões não foi detectada a presença dos OCP em estudo.

VI.5.1 ANÁLISE DAS INFUSÕES

Foram construídas curvas de adição de padrão para os 9 pesticidas em estudo. Estas curvas continham 6 diferentes pontos de massa adicionada (faixa entre 20 e 100 ng) incluindo o ponto zero (sem adição de padrão) realizados em triplicata. O valor médio foi utilizado para construção das curvas analíticas.

VI.5.2 EFEITO MATRIZ

Os primeiros cromatogramas obtidos com a adição de padrão na infusão apresentaram perda na detectabilidade dos analitos, por isso, foi feita uma comparação entre as curvas de adição em água e na infusão.

Esse teste foi aplicado para infusões de guaco e comparado com os resultados obtidos na adição de padrão em água. As curvas obtidas estão apresentadas nas Figuras VI.1-3.

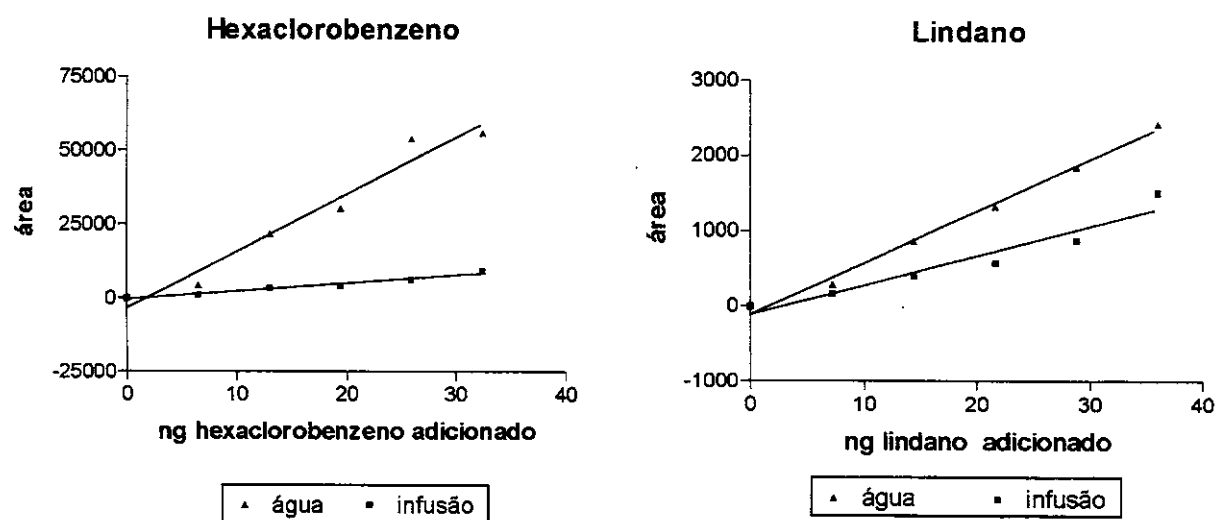


Figura VI.1 Curvas de adição de padrão do hexaclorobenzeno e lindano em água e na infusão de guaco para visualização do efeito matriz. Análises realizadas por SPME-GC-MS utilizando a fibra de PDMS sob imersão direta na amostra durante 60 min a 50 °C e

tempo e temperatura de desorção de 5 min e 270 °C. Demais condições cromatográficas já descritas no texto.

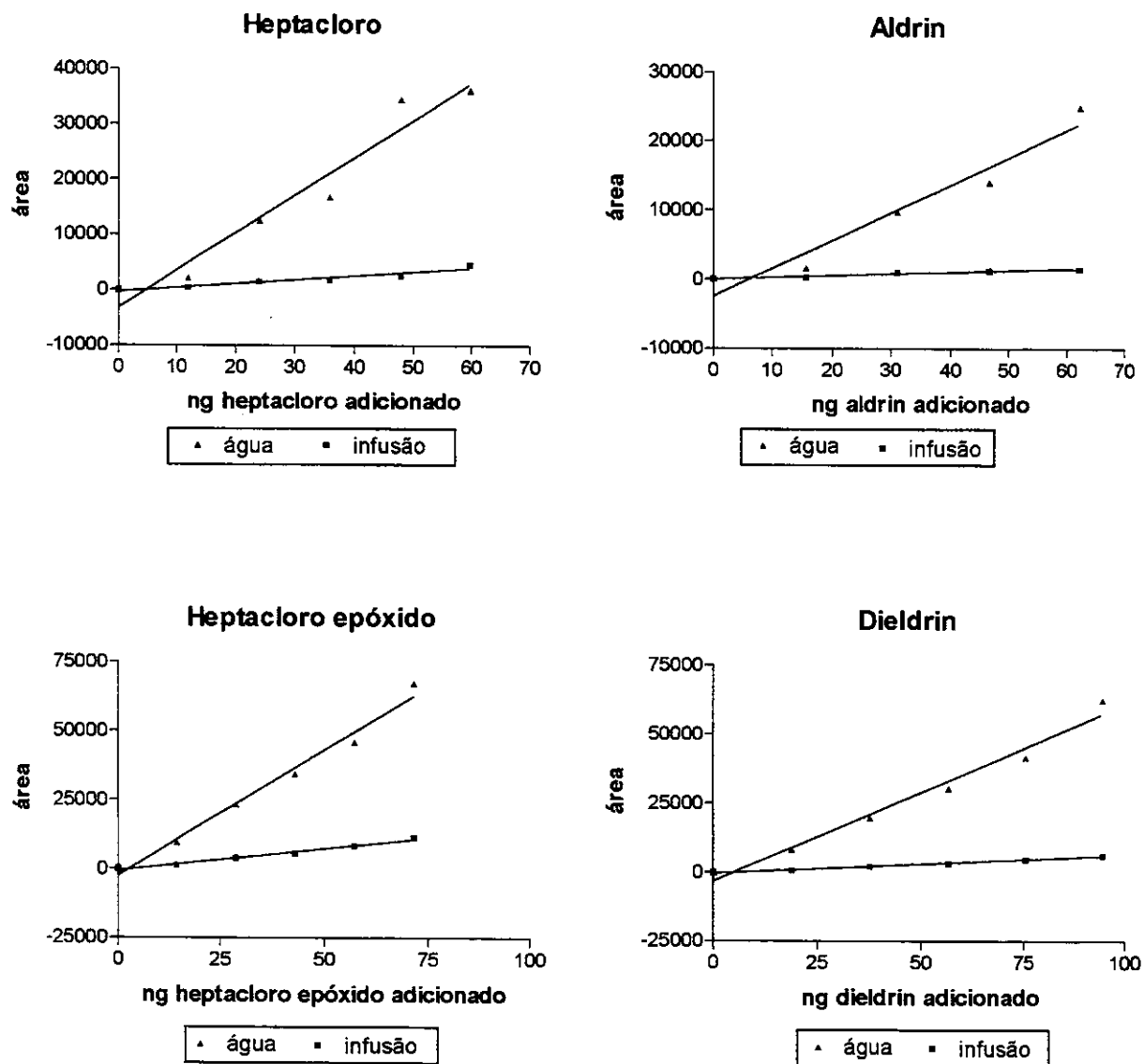


Figura VI.2 Curvas de adição de padrão do heptacloro, aldrin, heptacloro epóxido e dieldrin em água e na infusão de guaco para visualização do efeito matriz. Análises realizadas por SPME-GC-MS utilizando a fibra de PDMS sob imersão direta na amostra durante 60 min a 50 °C e tempo e temperatura de desorção de 5 min e 270 °C. Demais condições cromatográficas já descritas no texto.

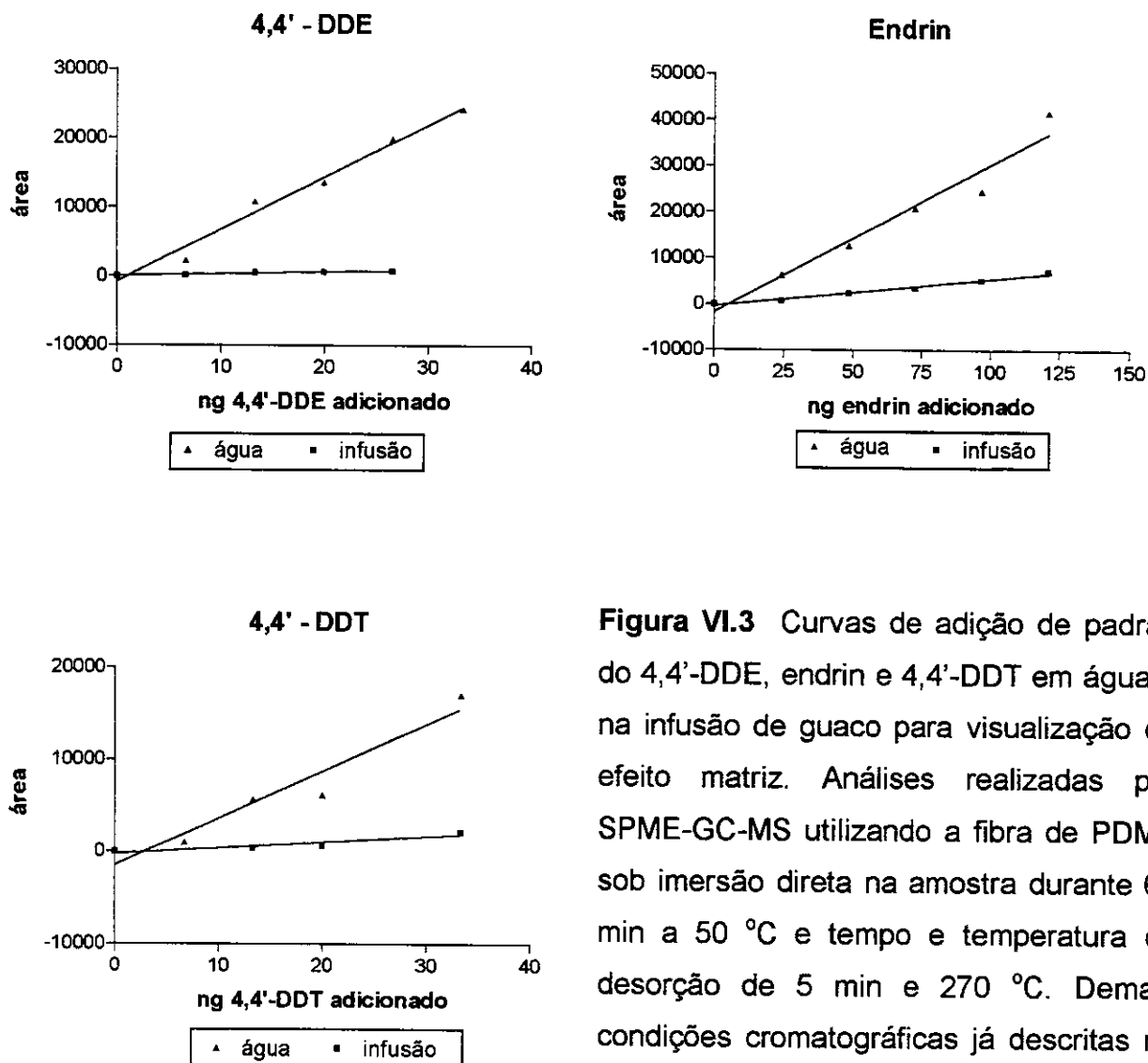


Figura VI.3 Curvas de adição de padrão do 4,4'-DDE, endrin e 4,4'-DDT em água e na infusão de guaco para visualização do efeito matriz. Análises realizadas por SPME-GC-MS utilizando a fibra de PDMS sob imersão direta na amostra durante 60 min a 50 °C e tempo e temperatura de desorção de 5 min e 270 °C. Demais condições cromatográficas já descritas no texto.

Pela análise dos gráficos acima, verifica-se uma acentuada diminuição do coeficiente angular da reta ou sensibilidade, comparando-se a adição dos OCP na água com a infusão de guaco. Esse fenômeno foi comum para todos os pesticidas estudados, indicando a interferência dos constituintes da matriz (efeito matriz) pela fase da fibra de PDMS.

A Tabela VI.2 compara os valores de sensibilidade do método SPME-GC-MS com a fibra de PDMS sob imersão direta na água e na infusão, ambas matrizes adicionadas dos padrões de OCP.

Tabela VI. 2 Sensibilidade do método SPME-GC-MS, comparando a imersão da fibra PDMS na água e na infusão de guaco.

Pesticidas	Sensibilidade (u.a. ng ⁻¹)		Perda (%)
	Água	Infusão	
Hexaclorobenzeno	1,93 . 10 ³	280	85
Lindano	68,6	39,2	43
Heptacloro	603	63,8	89
Aldrin	400	24,8	94
Heptacloro epóxido	913	159	83
Dieldrin	639	65,9	90
4,4'-DDE	759	30,0	96
Endrin	300	53,6	82
4,4'-DDT	509	63,7	87

Pelos resultados apresentados nas Figuras IV.1 a 3 e Tabela VI.2 fica evidente a perda de sensibilidade do método quando a fibra de PDMS é imersa na infusão (comparando com a imersão da mesma em água) devido ao grande número de interferentes extraídos da amostra.

Também foi realizado um ensaio de adição de padrão na infusão de espinheira santa, a fim de verificar a ocorrência desta perda de sensibilidade em outro tipo de amostra de infusão. Os valores obtidos dos coeficientes angulares das curvas de OCP para a infusão de espinheira santa apresentaram a mesma ordem de grandeza da infusão de guaco, o que sugere que a matriz vegetal das duas espécies tem efeito similar, mas não idêntico. Dessa forma, o ideal seria otimizar as condições da fibra diretamente na

matriz a ser usada no estudo, uma vez que dependendo de seus constituintes, a extração para a fibra será diferente. Porém esse procedimento é problemático quando se tem diferentes tipos de matrizes e também por se tratar de amostras vegetais com grande variabilidade biológica.

Para contornar o problema de interferência da matriz, o recomendado é construir a curva de calibração usando a própria infusão para veicular os pesticidas a serem sorvidos pela fibra. Porém, essa infusão deve ser isenta dos analitos de interesse, o que no nosso caso não foi possível, consequentemente, a solução encontrada foi utilizar o método de adição de padrão.

A perda de sensibilidade do método oscilou entre 80 - 90% (Tabela VI.2) para os OCP em estudo, exceto para o lindano, que mesmo sendo adicionado em água apresentou baixa detectabilidade devido ao baixo valor da sua constante de distribuição k da água para a fase de PDMS, conforme já discutido no capítulo anterior.

Embora vários autores tenham utilizado o método de imersão direta da fibra de PDMS para determinação dos OCP, a complexidade da matriz teve influência direta na sensibilidade do método, porém decidiu-se verificar se esta perda de sensibilidade inviabilizava totalmente a aplicação do método SPME-GC-MS sob imersão direta da fibra para determinação dos OCP em infusões. Para isso, foram determinados outros parâmetros de validação do método, aplicando-se o método de adição de padrão.

O método da adição de padrão é o método de calibração utilizado quando a matriz exerce grande influência na resposta do sistema analítico. Neste método a amostra é subdividida em várias frações antes da análise, e em cada fração é adicionada uma quantidade conhecida do analito e construída uma curva analítica, onde o valor extrapolado da curva indica o teor do analito na amostra. Este procedimento possui como principais desvantagens a necessidade de um grande volume de amostra para análise e o fato de tratar-se de um método de extrapolação e não de interpolação (MILLER & MILLER, 1993).

Esse método utiliza amostras fortificadas com diferentes quantidades do analito e todas diluídas para um mesmo volume para plotar a curva de calibração onde o eixo x representa as quantidades de analito adicionadas e y a área do pico. Considerando a

equação da reta $y = ax + b$, o ponto representado por $y = 0$ é dado por $x = -b/a$. Esse intercepto negativo representa a quantidade do analito presente na amostra.

Embora represente uma boa maneira de viabilizar o problema do efeito matriz, o método de adição de padrão apresenta algumas desvantagens: como a dificuldade de automação, necessita de quantidades maiores de amostra quando comparada com outros métodos, maior tempo de análise e estatisticamente, sua principal desvantagem se dá pelo fato de ser um método de extrapolação, menos preciso que as técnicas de interpolação.

VI.5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO SPME-GC-MS PARA DOSAGEM DOS OCP NAS INFUSÕES

Para validar o método SPME-GC-MS foram avaliados os seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, limites de detecção, limites de quantificação, repetibilidade (precisão intra-ensaio) e exatidão. Os resultados dos cinco primeiros parâmetros estão apresentados na Tabela VI.3.

Tabela VI.3 Parâmetros de validação para SPME-GC-MS aplicado para a infusão de guaco.

Pesticidas Organoclorados	Faixa linear (ng)	Sensibilidade (ua ng⁻¹)	Linearidade (r)	LOD (ng g⁻¹)	LOQ (ng g⁻¹)
Hexaclorobenzeno	0,100 - 51,9	280	0,9984	0,060	0,20
Lindano	6,00 - 50,4	39,2	0,9987	4,0	12
Heptacloro	0,300 - 63,0	63,8	0,9979	0,18	0,60
Aldrin	0,500 - 48,6	24,8	0,9975	0,40	1,0
Heptacloro epóxido	0,200 - 48,6	159	0,9970	0,12	0,40
Dieldrin	0,900 - 51,3	65,9	0,9989	0,60	1,8
4,4'-DDE	0,600 - 56,7	30,0	0,9972	0,40	1,2
Endrin	1,00 - 52,2	53,6	0,9971	0,60	2,0
4,4'-DDT	0,300 - 37,4	63,7	0,9981	0,16	0,60

Legenda: r = coeficiente de correlação; LOD = limite de detecção; LOQ = limite de quantificação.

Os resultados apresentados na Tabela VI.3 indicam a aplicabilidade do método para análise de infusões, pois os limites de quantificação obtidos permitem a determinação dos OCP em relação aos LMR estabelecidos (capítulo V).

A repetibilidade do método foi avaliada mediante determinação dos OCP sob estudo ($n = 5$) em 2 concentrações diferentes durante o mesmo dia. Os resultados obtidos para duas concentrações estão apresentados na Tabela VI.4.

Tabela VI.4 Precisão intra-ensaio na determinação dos OCP por SPME-GC-MS.

OCP	Massa (ng)	RSD (%) n=5	Massa (ng)	RSD (%) n=5
Hexaclorobenzeno	17,3	15	26,0	15
Lindano	8,40	10	16,8	12
Heptacloro	21,0	17	31,5	16
Aldrin	16,2	10	24,3	16
Heptacloro epóxido	16,2	13	24,3	4
Dieldrin	17,1	13	25,7	6
4,4' - DDE	18,9	15	28,4	10
Endrin	8,70	16	26,1	10
4,4' - DDT	18,7	8	28,1	7

Legenda: RSD - estimativa do desvio padrão relativo.

Pela análise da Tabela VI.4, observa-se que a estimativa do desvio padrão relativo oscilou na faixa entre 4 e 17% para os OCP em estudo.

A exatidão do método foi avaliada mediante teste de recuperação, onde para fortificações de cerca de 25 ng mL^{-1} dos OCP na infusão de guaco, as recuperações encontradas situaram-se na faixa entre 90 a 108 %.

VI.5.4 TAXA DE TRANSFERÊNCIA

O estudo da taxa de transferência dos pesticidas organoclorados presentes nas folhas para a infusão, foi realizado através da fortificação da amostra de guaco e posterior dosagem destes na infusão usando a técnica de SPME-GC-MS.

A taxa de transferência foi calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ transferência} = \frac{m_{\text{infusão}}}{m_{\text{folhas}} \times \text{conc}_{\text{folhas}}} \times 100$$

onde, $m_{\text{infusão}}$ = massa (ng) do pesticida encontrada na infusão

m_{folhas} = massa (g) da folha em 25 mL da infusão

$\text{conc}_{\text{folhas}}$ = concentração (ng g⁻¹) do pesticida na folha

A Tabela VI.5 apresenta os resultados obtidos na dosagem dos OCP na infusão de guaco (amostra fortificada) e os valores da taxa de transferência (%) considerando a quantidade adicionada na fortificação das folhas e a recuperada na infusão.

Tabela VI.5 Avaliação da taxa de transferência dos OCP da planta (guaco fortificado) para a infusão.

OCP	Fortificação ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Solubilidade em água ($\mu\text{g L}^{-1}$) *	Teor OCP encontrado		Taxa de transferência (%)
			Infusão (ng mL^{-1})	planta ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
Hexaclorobenzeno	10,9	5,8	3,88	0,194	1,8
Lindano	12,0	7300	8,08	0,404	3,4
Heptacloro	10,0	180	3,02	0,151	1,5
Aldrin	13,0	17	6,84	0,342	2,6
Heptacloro epóxido	11,9	275	4,44	0,222	1,9
Dieldrin	11,1	200	3,14	0,157	1,4
4,4' - DDE	11,1	65	4,80	0,240	2,2
Endrin	10,1	220	2,95	0,148	1,5
4,4' - DDT	11,1	1,2	0,752	0,0376	0,34

(*) Fonte: CHEE *et al.* (1999).

Pelos resultados apresentados na Tabela VI.5 verifica-se que a menor taxa de transferência foi obtida para o composto 4,4'-DDT, o que pode ser explicado pela sua baixa solubilidade em água ($1,2 \mu\text{g L}^{-1}$). De maneira geral, a taxa de transferência dos OCP presentes na planta para a infusão variou entre 0,34 e 3,4% para o 4,4'-DDT e o lindano, respectivamente. Esses baixos valores são devido à lipossolubilidade dos OCP.

Conforme apresentado no capítulo V, a análise das plantas cultivadas em Paulínia-SP mostraram contaminação por dieldrin (Tabela V.8), porém, considerando a baixa taxa de transferência dos OCP para a infusão (no caso, 1,4% para o dieldrin) este método não apresenta sensibilidade suficiente para detecção destes níveis na infusão. Isto foi comprovado experimentalmente, através da análise de infusões de guaco e espinheira santa sem fortificação prévia das folhas, utilizando o método de adição de padrão.

VI.6 CONCLUSÕES

A aplicação da técnica de SPME-GC-MS através da imersão direta da fibra de PDMS para a determinação dos OCP em infusões necessitou da utilização do método de adição de padrão, devido à interferência dos constituintes da matriz. Isto aumentou significativamente o tempo de análise devido à construção da curva analítica, das replicatas dos pontos da curva e do tempo de exposição da fibra de PDMS requerido para determinação dos OCP. Por outro lado, o ganho foi a baixa manipulação da amostra, que não necessitou de limpeza, apenas a exposição da fibra na infusão e transferência dos analitos para a análise por SPME-GC-MS, aliada à simplicidade da técnica de SPME e à alta seletividade do detetor de massas operando no modo SIM.

Apesar da perda de sensibilidade do método devida ao efeito matriz, foi possível quantificar os OCP na infusão na faixa entre 0,2 e $2,0 \text{ ng g}^{-1}$, exceto para o lindano que apresentou limite de quantificação de 12 ng g^{-1} devido ao seu baixo valor de k para a fibra de PDMS.

Com relação às taxas de transferência dos OCP para a infusão, obtidas a partir da amostra de guaco fortificada, conclui-se que os baixos valores encontrados são devido ao caráter hidrofóbico destes compostos.

CAPÍTULO VII - CONCLUSÕES FINAIS

De maneira geral, a realização deste trabalho de tese levou às seguintes conclusões finais:

A. Quanto aos níveis elevados de dieldrin encontrados nas plantas cultivadas em Paulínia-SP:

- As plantas medicinais provenientes do Campo Experimental de Paulínia-SP apresentaram níveis elevados de dieldrin, ou seja, acima do LMR expresso na Farmacopéia Européia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2001), o que pode ser consequência da poluição ambiental da região de Paulínia. O episódio de contaminação por pesticidas organoclorados, mais precisamente os drins (aldrin, dieldrin e endrin), nas margens do rio Atibaia pelo antigo complexo industrial Shell-Paulínia talvez possa explicar os níveis encontrados de dieldrin nas plantas estudadas, devido à proximidade do local, à facilidade de migração destes compostos através da água, migração por correntes de ar a partir de culturas vizinhas e a não utilização destes pesticidas no Campo Experimental.
- A possibilidade da contaminação, das plantas do Campo Experimental de Paulínia, por dieldrin ser proveniente da aplicação no solo foi descartada, pois as 3 culturas estudadas (guaco, espinheira santa e erva baleeira) encontram-se bem dispersas no Campo Experimental (cultivos distantes) e ao mesmo tempo os teores de dieldrin encontrados parecem bem similares, indicando uma homogeneidade do teor nas diferentes culturas. Outro fator complementar se deve ao fato de ter sido solicitado à uma empresa prestadora de serviços da região, um laudo sobre os teores dos OCP no solo do Campo Experimental de Paulínia, considerando diferentes pontos de coleta. Os resultados não mostraram índices de contaminação, embora, esta informação deva ser utilizada com muita cautela, uma vez que, esta análise foi realizada por terceiros, e não se tem conhecimento do método analítico empregado

e nem dos dados brutos da análise. Portanto, esta informação fica mais a nível ilustrativo.

- O cultivo de plantas medicinais deve ser evitado em regiões com altos níveis de poluição ambiental. As plantas cultivadas em Paulínia devem ser de uso exclusivo para pesquisas de campo e não para comercialização visando o consumo humano.

B. Quanto à metodologia analítica aplicada para análise de OCP nas folhas:

- A utilização do detetor seletivo de massas para a quantificação dos OCP foi muito satisfatória, pois apresentou níveis adequados de detecção dos analitos considerando os LMR estabelecidos, além de servir como ferramenta de confirmação.
- O método validado para determinação de OCP nas folhas utilizou a extração com solventes, seguida da limpeza em coluna mista de florisil e sílica e quantificação por GC-MS. Este método não apresentou muitas inovações analíticas, mas mostrou-se adequado e razoavelmente simples para a determinação simultânea de 9 OCP nas plantas estudadas quando comparado com o método oficial proposto.
- O procedimento que utiliza extração assistida por microondas (MAE) diretamente sobre as folhas em meio aquoso, e, subsequente análise por SPME-GC-MS, não foi aplicável para a análise das folhas devido à grande complexidade da matriz. Embora, este método tenha sido utilizado na determinação de OCP em algumas raízes de plantas medicinais, para a análise das folhas, a quantidade de interferentes extraídos pelo microondas dificultou a utilização da fibra de PDMS sob imersão no extrato, pois diminuiu consideravelmente a detectabilidade dos compostos na superfície restrita da fibra de PDMS. Talvez a utilização de um procedimento adicional de limpeza antes da imersão da fibra aumente a sensibilidade do método.

C. Quanto à metodologia para determinação dos OCP nas infusões:

- A determinação dos OCP em infusões através da imersão direta da fibra de PDMS mostrou uma perda considerável na sensibilidade da curva de adição de padrão

quando comparada com a adição dos padrões em água, isto ocorreu em consequência do grande número de interferentes da matriz particionados para a fibra. Embora exista uma queda acentuada na sensibilidade do método (SPME-GC-MS) quando a fibra de PDMS é utilizada sob imersão direta nas infusões, a utilização desta técnica apresentou bons níveis de detectabilidade (variando de 0,06 a 4 ng g⁻¹ para o hexaclorobenzeno e lindano, respectivamente).

- O tempo de exposição da fibra de PDMS requerido na determinação dos OCP somado ao tempo total de corrida cromatográfica foi longo (110 min), sem mencionar as repetições de injeção (triplicatas) e a construção da curva de adição de padrão, porém, o principal ganho foi atribuído à simplicidade da técnica e ao baixo manuseio da amostra, evitando assim a criação de artefatos na análise.

D. Quanto ao estudo da taxa de transferência e sugestão para trabalhos futuros:

- Devido à lipossolubilidade dos OCP, sua transferência da planta (folhas) para a infusão foi relativamente baixa (inferior a 4%), porém isso não reduz o perigo do consumo, visto a alta toxicidade destes compostos, seu efeito acumulativo e sua utilização para fins terapêuticos por pessoas com o estado físico debilitado.
- A infusão, sem dúvida, é uma das formas mais comumente empregada para o consumo de plantas medicinais, pela facilidade de seu preparo pela população em geral. Porém, estudos têm mostrado a grande utilização do óleo essencial obtido de plantas medicinais e aromáticas, no combate às mais diversas moléstias. Isto, somado à grande lucratividade do comércio de fitoterápicos (já discutido anteriormente no capítulo I), tem despertado grande interesse das indústrias farmacêuticas na comercialização de fitoterápicos a base de óleo essencial, tanto para uso externo como interno. Portanto, a determinação da taxa de transferência dos OCP da planta para o óleo essencial fica como sugestão para trabalhos futuros, uma vez que não faz parte do escopo desta tese.

E. Quanto à determinação de resíduos de OCP em plantas medicinais e fitoterápicos:

- A legislação brasileira não é muito clara quanto à obrigatoriedade da análise de contaminantes químicos, entre eles os OCP, em plantas medicinais e fitoterápicos, além do que, a fiscalização é praticamente inexistente. Porém, a contaminação global pelos OCP é fato, atingindo também as plantas medicinais (e, conseqüentemente os fitoterápicos), sendo assim, a determinação de seus resíduos nestas amostras é de fundamental importância e não constitui por si uma “propaganda negativa”, mas sim uma preocupação com sua qualidade.
- O avanço da tecnologia constitui um aliado no desenvolvimento de novas técnicas e equipamentos (com maiores níveis de detectabilidade) para a determinação de resíduos de pesticidas em matrizes complexas, como a matriz vegetal, buscando combinar simplicidade, rapidez e baixo custo deste tipo de análise.

CAPÍTULO VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-ARAB, A.A.K.; KAWTHER, M.S.; EL TANTAWY, M.E.; BADEAA, R.I.; KHAYRIA, N. Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in the Egyptian market. **Food Chemistry**, v. 67, n. 4, dec., p. 357-363, 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000 (DOU de 25 de fevereiro de 2000). Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Documento**, Brasília, p. 1-7, fev. 2000.

AGUIAR, L.S.J.; FIALHO, R.C.; AZEVEDO, C.M.A.; DINIZ, K.M. **Danos à vegetação por fluoretos gasosos em Paulínia-SP**. São Paulo: CETESB, 1992. 5p.

AGUILAR, C.; PEÑALVER, A.; POCURULL, E.; FERRÉ, J.; BORRULL, F.; MARCÉ, R.M. Optimization of solid-phase microextraction conditions using a response surface methodology to determine organochlorine pesticides in water by gas chromatography and electron-capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 844, p. 425-432, 1999.

ARTHUR, C.L. & PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

AZEVEDO, D.A.; LACORTE, S.; VINHAS, T.; VIANA, P.; BARCELÓ, D. Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 879, p. 13-26, 2000.

BARRIADA-PEREIRA, M.; CONCHA-GRAÑA, E.; GONZÁLEZ-CASTRO, M.J.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, E. Microwave-assisted extraction versus Soxhlet extraction in the analysis of 21 organochlorine pesticides in plants. **Journal of Chromatography A**, v. 1008, p. 115-122, 2003.

BELTRAN, J.; LOPEZ, F.J.; CEPRIA, O.; HERNANDEZ, F. Solid-phase microextraction for quantitative analysis of organophosphorus pesticides in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 808, p. 257-263, 1998.

BELTRAN, J.; LOPEZ, F.J.; CEPRIA, O.; HERNANDEZ, F. Solid-phase microextraction in residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 389-404, 2000.

BLUMENTHAL, A. & CERNY, M. Organochlorine pesticide residues in tea and coffee. **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, v. 67, n. 4, p. 515-520, 1976.

BUDEVARI, S.; O'NEIL, M.J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P.E. (Ed.). **The Index Merck: An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. Rahwag: Merck & Co., Inc., 1989. 1606 p.

CAI, L.; XING, J.; DONG, L.; WU, C. Application of polyphenylmethylsiloxane coated fiber for solid-phase microextraction combined with microwave-assisted extraction for the determination of organochlorine pesticides in Chinese teas. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, p. 11-21, 2003.

CAMEL, V. Supercritical fluid extraction as a useful method for pesticides determination. **Analisis**, v. 26, n.6, p. M 99- M 111, 1998.

CHEE, K.K.; WONG, M.K.; LEE, H.K. SPME for the determination of organochlorine pesticides in natural waters. IN: PAWLISZYN, J. **Applications of Solid Phase Microextraction**. Ontario: Royal Society of Chemistry, 1999, p. 212 – 226.

CHERNOVIZ, P.L.N. **A Grande Farmacopéia Brasileira: formulário e guia médico**. Belo Horizonte: Editora Itatiaia Limitada, 1996, v.2, p. 856-856.

CORREA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L.E.M. **Do cultivo à Terapêutica. Plantas Medicinais.** Petrópolis: Vozes, 1998, p. 125-126.

D'AMATO, C., TORRES, J. P. M., MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. **Química Nova**, v. 25, n. 6, nov-dez., p. 995-1002, 2002.

DA REDAÇÃO Cati aponta contaminação de produtos agrícolas em Betel. **O Momento**, Paulínia, 03 ago. 2001. Caderno, p.03.

DA REDAÇÃO Paulínia aprova a CEI da contaminação. **Folha de São Paulo**, Campinas, 26 jun. 2001. Ambiente, p. C3.

DI MUCCIO, A.; GENERALI, T.; BARBINI, D.A.; PELOSI, P.; AUSILI, A.; VERGORI, F. GIROLIMETTI, S. Single-step separation of organochlorine pesticide residues from fatty materials by combined use of solid-matrix partition and C18 cartridges. **Journal of Chromatography A**, v. 765, p. 61-68, 1997.

DI STASI, L.C **Plantas medicinais: arte e ciência.** São Paulo, Editora UNESP, 1995. 230p.

EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/EC. Implementing Council Directive 2002/657/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. IN: **Official Journal of the European Communities**, L221/8, 2002.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 4th edition, 2001. CD-ROOM.

FARIAS, M.R. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3^a ed. Porto Alegre, RS: Editora da Universidade/ UFRGS, 2001. cap. 12, p. 199-222.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4^a edição. São Paulo: Atheneu Editora, 1996.

GARCIA, E.S.; SILVA, A.C.P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C.B.V.; CAVALHEIRO, M.V.S.; SANTOS, R.R.; TOMASSINI, T. **Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas – Fitoterápicos**. Disponível em: <http://www.bdt.org.br/publicacoes/padct/bio/cap10/eloint.html>>. Acesso em: 24 jul. 2001.

GOTTLIEB, O.; KAPLAN, M.A. Das plantas medicinais aos fármacos naturais. **Ciência Hoje**, v.15, n.89, p.51, 1993.

GUPTA, M.P. **270 Plantas Medicinales Iberoamericanas**. Santafé de Bogotá: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnologia para el Desarrollo (CYTED), 1994. 617p.

HO, W. H. & HSIEH, S.J. Solid-phase microextraction associated with microwave assisted extraction of organochlorine pesticides in medicinal plants. **Analytica Chimica Acta**, v. 428, p. 111-120, 2001.

HU, R.; HENNION, B.; URRUTY, L.; MONTURY, M. Solid-phase microextraction of pesticide residues from strawberries. **Food Additives and Contaminants**, v. 16, p. 111-117, 1999.

HWANG, B.H. & LEE, M.R. Solid-phase microextraction for organochlorine pesticide residues analysis in Chinese herbal formulations. **Journal of Chromatography A**, v. 898, p. 245-256, 2000.

LACAVA, C.I.V.; ROMANO, J.; MARTINS, M.H.R.B. **Avaliação da qualidade do ar em Paulínia-SP jun-ago 98**. São Paulo: CETESB, 1999. 16p.

LACORTE, S.; GUIFFARD, I.; FRAISSE, D.; BARCELÓ, D. Broad spectrum analysis of 109 priority compounds listed in the 76/464/CEE Council Directive using solid-phase extraction and GC/EI/MS. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 7, apr. 1, p. 1430-1440, 2000.

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

LINO, C.M.; SILVEIRA, M.I.N. Extraction and clean-up methods for the determination of organochlorine pesticide residues in medicinal plants. **Journal of Chromatography A**, v. 769, p. 275-283, 1997.

LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002, 512 p.

MAGALHÃES, P. M. **O caminho medicinal das plantas**. Campinas: RZM Press, 1997. 120 p.

MAGDIC, S.; BOYDE-BOLAND, A.; JINNO, K.; PAWLISZYN, J.B. Analysis of organophosphorus insecticides from environmental samples using solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v.736, p. 219-228, 1996.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Single step clean-up and GC-MS quantification of organochlorine pesticide residues in spice powder. **Chromatographia**, v. 52, n. 11/12, dec., p. 787-790, 2000.

MELLO, J.C.P. **Inserção de monografias de plantas na Farmacopéia Brasileira**. In: VI JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 2003, São Pedro, SP, Mesa Redonda "Inserção de monografias de plantas na Farmacopéia Brasileira." 28/10/2003 na VI Jornada Paulista de Plantas Medicinais em Águas de São Pedro – SP).

MIÈGE, C. & DUGAY, J. Solid-phase microextraction and gas chromatography for rapid analysis of pesticides. **Analisis Magazine**, v. 26, n. 6, p. M137 – M143, 1998.

- MILLER, J.C. & MILLER, J.N. **Statistics for Analytical Chemistry**. 3^a ed. Chichester: Ellis Horwood, 1994. 218 p.
- MIYAHARA, M.; OKADA, Y.; TAKEDA, H.; AOKI, G.; KOBAYASHI, A.; SAITO, Y. Multiresidue procedures for the determination of pesticides in food using capillary gas chromatographic, flame photometric, and mass spectrometric techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 12, p. 2795-2802, dec., 1994.
- NUNES, M.V.; TAJARA, E.H. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 4, p. 372-383, jun., 1998.
- OLIVEIRA, E. **Preparação de amostras: evolução e perspectivas futuras**. Conferência apresentada no 11^o ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica, Campinas, 2001. Livro de Resumos. Campinas: R. Vieira Gráfica & Editora Ltda, 2001.
- PASTOR, A.; VÁSQUEZ, E.; CISCAR, R.; GUARDIA, M. Efficiency of the microwave-assisted extraction of hydrocarbons and pesticides from sediments. **Analytica Chimica Acta**, v. 344, p. 241-249, 1997.
- PEREIRA, N.A.; PEREIRA, B.M.R.; NASCIMENTO, M.C.; PARENTE, J.P.; MORS, W.B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes. **Planta Medica**, v. 60, p. 99-100, 1994.
- PIANOWSKI, L. **Desenvolvimento de fitoterápico**. In: VI JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 2003, São Pedro, SP, Mesa Redonda " Indústria farmacêutica de medicamentos fitoterápicos." 28/10/2003 na VI Jornada Paulista de Plantas Medicinais em Águas de São Pedro – SP).
- PIO CORRÊA, M. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 1942. V.3

POMPÉIA, S.L.; MARTINS, S.E.; PEREIRA, A. **Diagnóstico da contaminação e plano de recuperação de uma mata ciliar degradada por efluentes industriais em Paulínia-SP**. São Paulo: CETESB, 1993. 59p.

RUPPELT, B.M.; PEREIRA, E.F.R.; GONÇALVES, L.C.; PEREIRA, N.A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom: analgesic and antiinflammatory activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n.2, p. 203-205, 1991.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**, 2ª ed., Editora da UFSC e da UFRGS, Porto Alegre, 2000, 821 p.

SLOBODNÍK, J.; RAMALHO, S.; VAN BAAR, B.L.M.; LOUWER, A.J.H.; BRINKMAN, U.A.T. Determination of microcontaminants in sediments by on-line solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 41, n. 9, p. 1469-1478, nov., 2000.

STEVENSON, D.E.; WALBORG Jr, E.F.; NORTH, D.W.; SIELKEN Jr, R.L.; ROSS, C.E.; WRIGHT, A.S.; XU, Y.; KAMENDULIS, L.M.; KLAUNIG, J.E. Monograph: Reassessment of human cancer risk of aldrin/dieldrin. **Toxicology Letters**, v.109, p. 123-186, oct., 1999.

SU, P.; & HUANG, S. Determination of organophosphorus pesticides in water by solid-phase microextraction. **Talanta**, v. 49, p. 393-402, 1999.

SUASSUNA, K. **Contaminação em Paulínia por aldrin, dieldrin, endrin e outros compostos tóxicos produzidos e descartados pela Shell do Brasil S.A.** Disponível em: <http://www.greenpeace.org.br/toxicos/pdf/relatorio_shell_gp1.doc>. Acesso em 26 nov. 2003.

- TEKEL, J. & HATRÍK, S. Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean-up procedures and selective detectors. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 397-410, 1996.
- THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. The National Formulary. 25^a ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2002.
- TURNBULL, A. In: HESTER, R.E.; HARRISON, R.M. **Chlorinated organic micropollutants**. Letchworth, UK: The Royal Society of Chemistry, 1996. p. 113-135.
- VIDAL, J.L.M.; ARREBOLA, F.J.; MATEU-SÁNCHEZ, M. Application of gas chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of pesticides in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 959, p. 203-213, 2002.
- VILEGAS, J.H.Y. Técnicas modernas de extração e de análise cromatográfica aplicadas ao controle de qualidade de plantas medicinais brasileiras. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS. 3., 1997, Campinas. **Resumos**. Campinas: Racine, 1997. p.20-22.
- VILLA, M. Laudo aponta 156 contaminados em Paulínia. **Correio Popular**, Campinas, 24 ago. 2001, p. 5.
- WANG, Z.; HENNION, B.; URRUTY, L.; MONTURY, M. Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography: a complementary technique to solid-phase microextraction-gas chromatography for the analysis of pesticide residues in strawberries. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 11, p. 915-923, 2000.
- WHO/PHARM/92.559 **Quality control methods for medicinal plant material**, p. 37-62, WHO/PHARM, Geneva, 1992.

ANEXOS

ANEXO A



A.1 Foto por satélite da região de Paulínia-SP, mostrando em (1) o Campo Experimental; (2) antigo complexo industrial Shell – Paulínia e (3) Replan.

ANEXO B

Planejamento Fatorial 2^2 completo para otimização das condições operacionais da SPME:

B.1 HEXACLOROBENZENO

Tabela B.1 Estimativa dos efeitos sobre a massa recuperada (ng) de hexaclorobenzeno.

Variáveis	Efeitos
Tempo (L)	2,04*
Tempo (Q)	-1,14*
Temperatura (L)	-0,80*
Temperatura (Q)	-1,02*
Tempo x Temperatura	0,89*

Legenda: (L) = linear; (Q) quadrático; (*) valores significativos.

Tabela B.2 Análise de variância para ajuste do modelo quadrático aos dados obtidos com a Tabela V.7 para o hexaclorobenzeno.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	12,1759	5	2,4352	10,00	5,05
Resíduos	1,2171	5	0,2434		
Falta de ajuste	0,3667	3	0,1222	0,29	19,16
Erro puro	0,8504	2	0,4252		
Total	13,3930	10			

% de variação explicada = 90,91

% de variação explicável = 93,65

B.2 LINDANO

Tabela B.3 Estimativa dos efeitos sobre a massa recuperada (ng) do lindano.

Variáveis	Efeitos
Tempo (L)	0,2566*
Tempo (Q)	0,1229
Temperatura (L)	-0,2815*

Legenda: (L) = linear; (Q) quadrático; (*) valores significativos.

Tabela B.4 Análise de variância para ajuste do modelo quadrático aos dados obtidos com a Tabela V.7 para o lindano.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	0,3135	3	0,1045	7,09	4,35
Resíduos	0,1031	7	0,01473		
Falta de ajuste	0,1029	5	0,02058	156	19,30
Erro puro	0,000264	2	0,000132		
Total	0,4166	10			

% de variação explicada = 75,25

% de variação explicável = 99,94

B.3 HEPTACLORO

Tabela B.5 Estimativa dos efeitos sobre a massa recuperada (ng) do heptacloro.

Variáveis	Efeitos
Tempo (L)	2,4946*
Tempo (Q)	-0,8779
Temperatura (L)	-1,2839*
Temperatura (Q)	-1,9409*
Tempo x Temperatura	-0,9482

Legenda: (L) = linear; (Q) quadrático; (*) valores significativos.

Tabela B.6 Análise de variância para ajuste do modelo quadrático aos dados obtidos com a Tabela V.7 para o heptacloro.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	22,1054	5	4,4211	16,00	5,05
Resíduos	1,3818	5	0,2764		
Falta de ajuste	1,3549	3	0,4516	33,63	19,16
Erro puro	0,02685	2	0,01343		
Total	23,4872	10			

% de variação explicada = 94,12

% de variação explicável = 99,89

B.4 ALDRIN

Tabela B.7 Estimativa dos efeitos sobre a massa recuperada (ng) do aldrin.

Variáveis	Efeitos
Tempo (L)	1,4144*
Tempo (Q)	-0,3711
Temperatura (L)	-0,02942
Temperatura (Q)	-0,6672
Tempo x Temperatura	0,1242

Legenda: (L) = linear; (Q) quadrático; (*) valores significativos.

Tabela B.8 Análise de variância para ajuste do modelo quadrático aos dados obtidos com a Tabela V.7 para o aldrin.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	3,8889	5	0,7778	2,91	5,05
Resíduos	1,3348	5	0,2670		
Falta de ajuste	0,4404	3	0,1468	0,33	19,16
Erro puro	0,8944	2	0,4472		
Total	5,2237	10			

% de variação explicada = 74,45

% de variação explicável = 82,88

B.5 HEPTACLORO EPÓXIDO

Tabela B.9 Estimativa dos efeitos sobre a massa recuperada (ng) do heptacloro epóxido.

Variáveis	Efeitos
Tempo (L)	3,1973*
Tempo (Q)	-1,4747*
Temperatura (L)	-0,3098
Temperatura (Q)	-1,4245*
Tempo x Temperatura	-0,3799

Legenda: (L) = linear; (Q) quadrático; (*) valores significativos.

Tabela B.10 Análise de variância para ajuste do modelo quadrático aos dados obtidos com a Tabela V.7 para o heptacloro epóxido.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	25,3690	5	5,0738	13,60	5,05
Resíduos	1,8661	5	0,3732		
Falta de ajuste	1,7475	3	0,5825	9,83	19,16
Erro puro	0,1185	2	0,05925		
Total	27,2350	10			

% de variação explicada = 93,15

% de variação explicável = 99,56

B.6 DIELDRIN

Tabela B.11 Estimativa dos efeitos sobre a massa recuperada (ng) do dieldrin.

Variáveis	Efeitos
Tempo (L)	3,3345*
Tempo (Q)	-1,1778*
Temperatura (L)	0,4880
Temperatura (Q)	-1,1465*
Tempo x Temperatura	0,2877

Legenda: (L) = linear; (Q) quadrático; (*) valores significativos.

Tabela B.12 Análise de variância para ajuste do modelo quadrático aos dados obtidos com a Tabela V.7 para o dieldrin.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	25,7444	5	5,1489	18,69	5,05
Resíduos	1,3776	5	0,2755		
Falta de ajuste	1,3145	3	0,4382	13,88	19,16
Erro puro	0,06314	2	0,03157		
Total	27,1220	10			

% de variação explicada = 94,92

% de variação explicável = 99,77

B.7 4,4'-DDE

Tabela B.13 Estimativa dos efeitos sobre a massa recuperada (ng) do 4,4'-DDE.

Variáveis	Efeitos
Tempo (L)	2,2222*
Tempo (Q)	-0,9425
Temperatura (L)	0,9962
Temperatura (Q)	-1,2002
Tempo x Temperatura	0,6842

Legenda: (L) = linear; (Q) quadrático; (*) valores significativos.

Tabela B.14 Análise de variância para ajuste do modelo quadrático aos dados obtidos com a Tabela V.7 para o 4,4'-DDE.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	14,9000	5	2,9800	7,41	5,05
Resíduos	2,0117	5	0,4023		
Falta de ajuste	1,7731	3	0,5910	4,95	19,16
Erro puro	0,2386	2	0,1193		
Total	16,9116	10			

% de variação explicada = 88,11

% de variação explicável = 98,59

B.8 ENDRIN

Tabela B.15 Estimativa dos efeitos sobre a massa recuperada (ng) do endrin.

Variáveis	Efeitos
Tempo (L)	1,8699*
Tempo (Q)	-0,7350
Temperatura (L)	0,09128
Temperatura (Q)	-0,9466
Tempo x Temperatura	0,1673

Legenda: (L) = linear; (Q) quadrático; (*) valores significativos.

Tabela B.16 Análise de variância para ajuste do modelo quadrático aos dados obtidos com a Tabela V.7 para o endrin.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	8,6253	5	1,7251	5,72	5,05
Resíduos	1,5087	5	0,3017		
Falta de ajuste	1,4645	3	0,4882	22,08	19,16
Erro puro	0,04422	2	0,02211		
Total	10,1340	10			

% de variação explicada = 85,11

% de variação explicável = 99,56

B.9 4,4'-DDT

Tabela B.17 Estimativa dos efeitos sobre a massa recuperada (ng) do 4,4'-DDT.

Variáveis	Efeitos
Tempo (L)	1,3409*
Tempo (Q)	-0,6536*
Temperatura (L)	1,0663*
Temperatura (Q)	-0,2395
Tempo x Temperatura	0,8291*

Legenda: (L) = linear; (Q) quadrático; (*) valores significativos.

Tabela B.18 Análise de variância para ajuste do modelo quadrático aos dados obtidos com a Tabela V.7 para o 4,4'-DDT.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	7,1636	5	1,4327	47,63	5,05
Resíduos	0,1504	5	0,03008		
Falta de ajuste	0,03962	3	0,01321	0,24	19,16
Erro puro	0,1108	2	0,05540		
Total	7,4644	10			

% de variação explicada = 95,97

% de variação explicável = 98,52