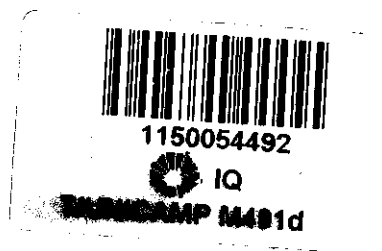


TESE DE DOUTORADO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS E DE
NOVOS MATERIAIS PARA DETERMINAÇÃO
MULTIRRESÍDUO DE PESTICIDAS EM UVA E TOMATE POR
CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Lúcio Flávio Costa Melo



Orientadora: Prof^a Dr^a Isabel Cristina Sales Fontes Jardim
Co-Orientadora: Dr^a Vera Lúcia Ferracini (Embrapa Meio Ambiente)

Fevereiro / 2003



**INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

UNIDADE	ICA
Nº CHAMADA	UNICAMP
	M491d
V	EX
TOMBO BC	54492
PROC.	124/03
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	29/06/03
Nº CPD	

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

CM00186732-4

BIB II 295341

M491d

Melo, Lúcio Flávio Costa

Desenvolvimento de metodologias e de novos materiais para determinação multirresíduo de pesticidas em uva e tomate por cromatografia líquida de alta eficiência / Lúcio Flávio Costa Melo. -- Campinas, SP: [s.n], 2003.

Orientadora: Isabel Cristina S. F. Jardim.

Co-orientadora: Vera Lúcia Ferracini.

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

1. Multirresíduo de pesticida. 2. Análise de uva e tomate. 3. Validação de metodologias. 4. Extração em fase sólida. I. Jardim, Isabel Cristina S. F. II. Ferracini, Vera Lúcia. III. Universidade Estadual de Campinas. IV. Título.

Dedico este trabalho

*À minha esposa,
Joely,*

*Aos meus pais,
Ovídio e Vitória,*

*À memória de meus avós,
Dario e Isabel,
José e Maria*

*e
À memória de meu sogro,
João Pinheiro.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço

à Prof^a Dr^a Isabel Jardim, pela orientação segura, pela disponibilidade, pela liberdade que sempre deu aos seus alunos para conduzirem suas pesquisas com autonomia, pelo apoio, pelas portas que sempre nos abriu, pela convivência alegre, pela amizade;

à Dr^a Vera Lúcia Ferracini, pela co-orientação, pela ajuda na escolha dos pesticidas que foram estudados, pelo auxílio na obtenção de padrões e nas questões relativas à análise de frutos e validação de metodologias;

aos Professores membros da Banca Examinadora pelas discussões, sugestões e correções;

à Dr^a Sonia C.N. Queiroz, pela amizade, pelas discussões e pela fundamental parceria no desenvolvimento de novos materiais para SPE;

aos Professores Kenneth e Carol Collins, pelas discussões, esclarecimentos e ajudas, pelo exemplo de vida, de vigor intelectual, de entusiasmo e de amor à ciência;

à minha esposa Joely, pelo amor, carinho, paciência e companheirismo que me tem dedicado todos os dias, sejam alegres ou tristes;

aos meus familiares, pela paciência e compreensão pelos momentos que estive ausente do convívio familiar, especialmente nos vários sábados e domingos dedicados à conclusão deste trabalho;

aos amigos do Labcrom: 7 anos (mestrado e doutorado) de convivência, amizades, desafios, realizações. Muito obrigado a todos que participaram comigo desse período e a todos os que vieram antes de nós e que ajudaram a criar tantas histórias do nosso grupo de pesquisa;

aos funcionários do Instituto de Química que, direta ou indiretamente, deram suporte a esse trabalho;

a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

à FAPESP, pelo apoio financeiro e pelo importante acompanhamento, via assessoria científica, do andamento dos trabalhos, pelas sugestões e críticas;

e

à Deus, pela vida e por mais um objetivo cumprido.

*“Nossa experiência não deve nunca cessar
e o final de toda nossa experiência
será voltar ao ponto de onde partimos
e só então o conhecer pela primeira vez.”*

(T.S. Eliot)

RESUMO

Desenvolvimento de Metodologias e de Novos Materiais para Determinação Multirresíduo de Pesticidas em Uva e Tomate por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Autor: Lúcio Flávio Costa Melo

Orientadora: Prof^a Dr^a Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Co-Orientadora: Dr^a Vera Lúcia Ferracini (Embrapa Meio Ambiente)

Palavras-chave: multirresíduo de pesticidas, extração em fase sólida, análise de uva e tomate, cromatografia líquida de alta eficiência, validação de metodologias

Os pesticidas são utilizados na agricultura para prevenção e controle de pragas e doenças, apresentando riscos à saúde humana e ao meio ambiente, se utilizados de forma indiscriminada. Foram desenvolvidas e validadas metodologias para determinação multirresíduo do fungicida benomil (benzimidazol) e dos herbicidas tebutiuron, diuron (derivados de uréia), simazina, atrazina e ametrina (triazinas) em uva e tomate. Os métodos se basearam na Extração em Fase Sólida (SPE) e Extração Líquido-Líquido (LLE), para preparação de amostra, e na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em fase reversa, com detecção UV a 235 nm, para separação e quantificação dos pesticidas. Foram aplicados materiais para SPE do tipo aminopropil (NH₂) e octadecil (C18) desenvolvidos no próprio laboratório, cujo desempenho foi comparado com materiais similares disponíveis no mercado. Os materiais aminopropil desenvolvidos no laboratório apresentaram melhores resultados, com recuperações entre 50 e 120% e precisões abaixo de 15%, valores estes dentro dos limites aceitáveis, segundo as principais diretrizes para validação de metodologias. Os limites de quantificação (LOQ) do método, abaixo de 86 µg kg⁻¹, mostraram que os métodos desenvolvidos têm a capacidade de detectar pesticidas em níveis abaixo dos Limites Máximos de Resíduos (MRL) permitidos pela legislação, 100 µg kg⁻¹. Estes resultados, juntos com os demais parâmetros de validação, atestam a aplicabilidade dos métodos desenvolvidos para a análise multirresíduo de pesticidas em uva e tomate. A produção de sorventes para SPE no próprio laboratório mostrou-se viável, sendo um processo simples, de menor custo e menos tóxico, resultando em autossuficiência na obtenção destes materiais.

ABSTRACT

Development of Methodologies and New Materials for High-Performance Liquid Chromatographic Multiresidue Determination of Pesticides in Grapes and Tomatoes

Author: Lúcio Flávio Costa Melo

Supervisor: Prof^a Dr^a Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Co-Supervisor: Dr^a Vera Lúcia Ferracini (Embrapa Meio Ambiente)

Keywords: multiresidue pesticide determination, solid-phase extraction, grape and tomato analysis, high performance liquid chromatography, method validation

Pesticides are usually used in agriculture to protect crops. However, they may have deleterious effects to the environment and to living organisms when used improperly. This study developed methodologies for multiresidue analysis of the fungicide benomyl (benzimidazol) and of the herbicides tebuthiuron, diuron (ureia herbicides), simazine, atrazine and ametryn (triazines), used on grapes and tomatoes. Solid-Phase Extraction (SPE) and Liquid-Liquid Extraction (LLE) were employed in sample preparation. Lab-made aminopropyl (NH₂) and octadecyl (C18) SPE materials were developed and compared with similar commercial materials. Reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), with 235 nm UV detection, was used for separation and quantification of the pesticides. The results obtained for spiked grapes and tomatoes showed better performance of the lab-made aminopropyl material, with recovery between 50 and 120% and precision below 15%, values in agreement with the principal guidelines for method validation. Limits of quantification (LOQ) of the method, below 86 µg kg⁻¹, showed that the methods developed have the capacity to detect pesticides at levels below the usual Maximum Limits of Residues (MLR), approximately 100 µg kg⁻¹. These results, with the other validation parameters, show the methods developed can be applied for the multiresidue analysis of pesticides in grapes and tomatoes. The production of SPE materials in the laboratory is viable, through a simple process, of lesser cost and with lesser quantities of toxic residues, which result in economy and self-sufficiency in the obtaining of these materials.

SÚMULA CURRICULAR

Formação Acadêmica

- Mestre em Química Analítica
Universidade Estadual de Campinas, 1998
"Desenvolvimento de Fases Estacionárias C-8 Sorvidas e Imobilizadas para CLAE a partir de Sílica Zirconizada"
Orientadora: Prof^a Dr^a Isabel Cristina Sales Fontes Jardim
- Bacharel em Química com atribuições tecnológicas
Universidade Estadual de Campinas, 1995

Produção Científica

- Artigos Publicados em Periódicos Indexados:
 1. Pozzebon, J.M., Queiroz, S.C.N., Melo, L.F.C., Kapor, M.A., Jardim, I.C.S.F.; *Application of new high-performance liquid chromatography and solid-phase extraction materials to the analysis of pesticides in human urine*; **Journal of Chromatography A**, 987 (2003) 381-387. (EM ANEXO)
 2. Queiroz, S.C.N., Melo, L.F.C., Jardim, I.C.S.F.; *Poly(methyloctadecylsiloxane) immobilized on silica by gamma radiation for use in solid-phase extraction*; **Journal of Chromatography A**, 948 (2002) 171-176. (EM ANEXO)
 3. Bachmann, S., Melo, L.F.C., Silva, R.B., Anazawa, T.A., Jardim, I.C.S.F., Collins, K.E., Collins, C.H., Albert, K.; *Synthesis and Solid-State NMR Investigation of Radiation-Immobilized Polysiloxanes on Bare, Titanium-Grafted, and Zirconium-Grafted Silicas*; **Chemistry of Materials**, 13 (2001) 1874-1879.
 4. Melo, L.F.C., Collins, C.H., Collins, K.E., Jardim, I.C.S.F.; *Stability of HPLC columns packed with poly(methyloctylsiloxane) sorbed and radiation-immobilized onto porous silica and zirconized silica*; **Journal of Chromatography A**, 869 (2000) 129-135.
 5. Melo, L.F.C., Jardim, I.C.S.F.; *Development of C8 stationary phases, immobilized by gamma radiation on zirconized silica, for high-performance liquid chromatography applications*; **Journal of Chromatography A**, 845 (1999) 423-431.
 6. Melo, L.F.C., Morgano, M.A., Mantovani, D.M.B.; *Avaliação do Teor de Arsênio Total em Pescado de Água Doce*; **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 58(2) (1999) 81-86.
- Citações na literatura científica: 29
- Comunicações em Congressos Internacionais: 08
- Comunicações em Congressos Nacionais: 21

Produção Tecnológica (patente)

- Universidade Estadual de Campinas
Jardim, I.C.S.F., Melo, L.F.C., Queiroz, S.C.N.; *Processo de Confecção de Cartucho Tipo C18 Obtido via Tratamento Térmico para Uso em Extração em Fase Sólida (SPE)*; Pedido de patente depositado em 09-Fev-2001, Nº PI0100578-2.

Premiações

- **“PRÊMIO DE MELHOR POSTER”** na 22ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química (Mai-1999) pelo trabalho *“Otimização de Condições para Preparação de Fases Estacionárias e Enchimento de Colunas para CLAE com Sílica Zirconizada”*
- **“BEST POSTER AWARD”** no 7th Latin-American Congress on Chromatography (Mar-1998) pelo trabalho *“Comparison Among Columns Packed with Sorbed C-8 Stationary Phase on Silica and Zirconized Silica for HPLC Applications”*

Participações em Órgãos Colegiados

- Membro Titular da Congregação da Faculdade de Engenharia Química - Unicamp
- eleito para o mandato de 31-Out-2002 a 30-Out-2004
- Conselheiro do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química - Unicamp
- indicado; período de 01-Dez-2000 até 14-Jan-2002
- Membro Titular da Comissão de Pós-Graduação (CPG) do Instituto de Química - Unicamp
- eleito; mandato de 01-Dez-1999 a 30-Nov-2000
- eleito; mandato de 01-Dez-1998 a 30-Nov-1999

ÍNDICE GERAL

Índice Geral.....	xvii
Índice de Figuras.....	xix
Índice de Tabelas.....	xxi
Lista de Abreviações.....	xxiii
1. Introdução.....	01
Contextualização do Problema.....	03
Fruticultura.....	03
Pesticidas.....	04
Toxicologia.....	06
Legislação.....	10
Ações mitigatórias e alternativas ao uso de pesticidas.....	12
Análise Química de Pesticidas.....	14
Análise Multirresíduo.....	15
Preparo de Amostras.....	19
Extração Líquido-Líquido.....	20
Extração em Fase Sólida.....	20
Modos de operação.....	21
Mecanismos de separação.....	23
Dispositivos.....	25
Fases sólidas a partir de polissiloxanos.....	26
Outros conceitos de fases sólidas.....	27
Mecanização da SPE.....	28
Validação de Metodologias.....	29
2. Objetivos.....	35
3. Experimental.....	37
Materiais.....	39
Reagentes e Solventes.....	39
Padrões de pesticidas.....	40
Colunas cromatográficas.....	40
Materiais para SPE.....	40
Equipamentos.....	40
Estratégia Experimental.....	41
Desenvolvimento das Fases Sólidas.....	42
Preparação das fases sólidas.....	42
Caracterização.....	43
Confecção dos cartuchos.....	44
Desenvolvimento das Metodologias de Análise.....	44
Estudo espectrofotométrico dos pesticidas.....	44
Soluções-padrão e calibração.....	45
Calibração na matriz.....	45
Fortificação das amostras.....	46
Amostragem e estocagem das amostras.....	46
Condições cromatográficas.....	46
Procedimento de preparo das amostras.....	47
Procedimento para cartuchos aminopropil (NH ₂).....	47
Procedimento para cartuchos octadecil (C18).....	48
Validação das metodologias.....	48

Análise de uvas e tomates do varejo.....	49
4. Apresentação e Análise dos Resultados.....	51
Desenvolvimento das Fases Sólidas.....	53
Preparação e caracterização.....	53
Desenvolvimento das Metodologias de Análise.....	63
Estudo espectrofotométrico dos pesticidas.....	63
Identidade dos picos cromatográficos.....	65
Procedimento de preparo das amostras.....	68
Validação das metodologias.....	70
Seletividade.....	70
Calibração.....	73
Limites de Detecção (LOD) e Limites de Quantificação (LOQ).....	75
Exatidão e Precisão.....	77
Análise de uvas e tomates do varejo.....	90
Análise de uvas e tomates do varejo com fortificação das amostras.....	94
Estudo sobre o efeito da matriz.....	96
5. Conclusões.....	103
Direcionamentos Futuros.....	108
6. Referências Bibliográficas.....	109
Anexos.....	125

ÍNDICE DE FIGURAS

1 - Evolução no consumo de defensivos agrícolas no Brasil.....	06
2 - Estruturas de algumas triazinas.....	08
3 - Extração em Fase Sólida; modo <i>clean-up</i>	21
4 - Extração em Fase Sólida; modo pré-concentração.....	22
5 - Exemplo de reação de modificação da sílica.....	24
6 - Polímeros estudados.....	53
7 - Espectros IV da sílica e dos polímeros PDMS aminofuncionalizado e PMODS.....	56
8 - Espectros IV de fases sólidas aminopropil comercial e <i>lab-made</i>	58
9 - Espectros IV de fases sólidas octadecil comercial e <i>lab-made</i>	59
10 - Termogramas das fases sólidas.....	61
11 - Espectros de absorção no ultravioleta dos pesticidas estudados.....	64
12 - Cromatogramas dos padrões de pesticidas.....	66
13 - Cromatogramas de análises em branco de uva e tomate.....	70
14 - Cromatogramas de análises de uvas fortificadas.....	71
15 - Cromatogramas de análises de tomates fortificados.....	72
16 - Cromatogramas de uva e tomate fortificados, sem a etapa de SPE.....	73
17 - Curvas analíticas típicas, obtidas no intervalo de 50 a 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$	74
18 - Resultados de recuperação, repetibilidade e precisão intermediária. Extração em uvas, empregando cartucho aminopropil comercial.....	80
19 - Resultados de recuperação, repetibilidade e precisão intermediária. Extração em uvas, empregando cartucho aminopropil <i>lab-made</i> 40%.....	81
20 - Resultados de recuperação, repetibilidade e precisão intermediária. Extração em uvas, empregando cartucho aminopropil <i>lab-made</i> 10%.....	82
21 - Resultados de recuperação, repetibilidade e precisão intermediária. Extração em uvas, empregando cartucho octadecil comercial.....	83
22 - Resultados de recuperação, repetibilidade e precisão intermediária. Extração em uvas, empregando cartucho octadecil <i>lab-made</i>	84
23 - Resultados de recuperação, repetibilidade e precisão intermediária. Extração em tomates, empregando cartucho aminopropil comercial.....	85
24 - Resultados de recuperação, repetibilidade e precisão intermediária. Extração em tomates, empregando cartucho aminopropil <i>lab-made</i> 40%.....	86
25 - Resultados de recuperação, repetibilidade e precisão intermediária. Extração em tomates, empregando cartucho octadecil comercial.....	87
26 - Resultados de recuperação, repetibilidade e precisão intermediária. Extração em tomates, empregando cartucho octadecil <i>lab-made</i>	88
27 - Cromatogramas de amostras de uva do varejo analisadas em cartuchos de aminopropil comercial.....	91
28 - Cromatogramas de amostras de uva do varejo analisadas em cartuchos de aminopropil <i>lab-made</i> 40%.....	91
29 - Cromatogramas de amostras de uva do varejo analisadas em cartuchos de aminopropil <i>lab-made</i> 40%.....	92
30 - Cromatogramas de amostras de tomate do varejo analisadas em cartuchos de aminopropil comercial.....	93
31 - Cromatogramas de amostras de tomate do varejo analisadas em cartuchos NH_2 <i>lab-made</i> 40%.....	93

32 - Cromatogramas de amostras de tomate do varejo analisadas em cartuchos de aminopropil comercial.....	94
33 - Cromatogramas de amostras de uva e tomate do varejo analisadas pela metodologia desenvolvida para cartuchos de aminopropil comercial e <i>lab-made</i> 40%; nível de fortificação F1.....	95
34 - Calibração na matriz; matriz: uva; cartucho aminopropil comercial.....	97
35 - Calibração na matriz; matriz: tomate; cartucho aminopropil comercial.....	97
36 - Calibração na matriz; matriz: uva; cartucho octadecil comercial.....	98
37 - Calibração na matriz; matriz: tomate; cartucho octadecil comercial.....	98

ÍNDICE DE TABELAS

1 - Principais classes de pesticidas.....	05
2 - Classificação dos pesticidas por periculosidade.....	07
3 - Pesticidas estudados.....	08
4 - Características físico-químicas e toxicológicas das triazinas estudadas.....	09
5 - Características físico-químicas e toxicológicas do diuron e tebutiuron.....	09
6 - Características físico-químicas e toxicológicas do benomil.....	10
7 - Sumário de artigos envolvendo determinação de pesticidas em frutas e vegetais...	16
8 - Principais técnicas de preparo de amostra.....	19
9 - Amostras e cartuchos utilizados no desenvolvimento das metodologias.....	47
10 - Características das fases sólidas desenvolvidas, comerciais e sílica.....	54
11 - Resultados de TGA para fases sólidas comerciais e <i>lab-made</i>	62
12 - Resultados de análise de área superficial específica.....	62
13 - Valores de λ_{max} e de absorvidade molar (ϵ) dos pesticidas estudados.....	65
14 - Espectros dos padrões de pesticidas extraídos do cromatograma tridimensional e obtidos a partir de solução do padrão puro.....	67
15 - Quantidades calculadas para fortificação inicial das amostras.....	69
16 - Quantidades envolvidas no cálculo das soluções finais.....	70
17 - Recuperações para pesticidas em uva e tomate sem a etapa de SPE.....	73
18 - Parâmetros das curvas analíticas.....	75
19 - Limites de detecção e quantificação.....	76
20 - LOQ do método e valores de MRL de diferentes legislações.....	77
21 - Recuperações e precisões para pesticidas em uva.....	78
22 - Recuperações e precisões para pesticidas em tomate.....	79
23 - Tabela de acertos por parâmetro e nível de fortificação.....	89
24 - Tabela de acertos por pesticida.....	89
25 - Recuperações e repetibilidades para pesticidas em uva e tomate do varejo, em nível de fortificação F1, empregando cartuchos aminopropil comercial e <i>lab-made</i> ..	96
26 - Parâmetros da curva analítica, obtidos via calibração na matriz.....	99
27 - Limites de detecção e quantificação obtidos via calibração na matriz.....	100

LISTA DE ABREVIações

- ADI (Acceptable Daily Intake): Ingestão Diária Aceitável
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AOAC: Association of Official Analytical Chemists
- C18: octadecil
- COP: Contaminantes Orgânicos Persistentes
- CV: coeficiente de variação
- EPA (Environmental Protection Agency): Agência de Proteção Ambiental (Estados Unidos)
- Et: etil
- FAO: Food and Agriculture Organization
- FDA: Food and Drug Administration (Estados Unidos)
- GARP: Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas
- GC (Gas Chromatography): Cromatografia Gasosa
- GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry): Cromatografia Gasosa com Detecção por Espectrometria de Massas
- GC-ECD (Gas Chromatography-Electron-Capture Detection): Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Elétrons
- GC-NPD (Gas Chromatography-Nitrogen-Phosphorous Detector): Cromatografia Gasosa com Detector de Nitrogênio-Fósforo
- GPC (Gel Permeation Chromatography): Cromatografia de Permeação em Gel
- HPLC (High Performance Liquid Chromatography): Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- i-Pr: isopropil
- ICH: International Conference on Harmonisation
- IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry
- IV: Infravermelho
- JMPR: Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues
- LC-DAD (Liquid Chromatography-Diode Array Detector): Cromatografia Líquida com Detecção por Arranjo de Diodos
- LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry): Cromatografia Líquida com Detector por Espectrometria de Massas
- LD₅₀: Dose Letal Mediana
- LLE (Liquid-Liquid Extraction): Extração Líquido-Líquido
- LLME (Liquid-Liquid Microextraction): Micro-Extração Líquido-Líquido
- LOD (Limit of Detection): Limite de Detecção
- LOQ (Limit of Quantification): Limite de Quantificação
- MAE (Microwave-Assisted Extraction): Extração Assistida por Microondas
- MIP (Molecularly Imprinted Polymers): Polímeros Impressos Molecularmente
- MMC (Matrix-Matched Calibration): Calibração na Matriz
- MMS (Mixed Mode Sorbents): Sorventes de Modo Misto
- MRL (Maximum Residue Levels): Limites Máximos de Resíduos (LMR)
- MSPD (Matrix Solid Phase Dispersion): Dispersão da Matriz em Fase Sólida
- OMC: Organização Mundial do Comércio
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- ONU: Organização das Nações Unidas
- PFE (Pressurized Fluid Extraction): Extração em Fluido Pressurizado
- PIB: Produto Interno Bruto

- PDMS: Poli(dimetilsiloxano)
- PMODS: poli(metiloctadecilsiloxano)
- PTFE: politetrafluoroetileno
- RAM (Restricted Access Matrix): Fases de Acesso Restrito
- RSD (Relative Standard Deviation): estimativa do desvio padrão relativo
- SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction): Extração por Sorção em Barra Magnética
- SFE (Supercritical Fluid Extraction): Extração em Fluido Supercrítico
- SPE (Solid-Phase Extraction): Extração em Fase Sólida
- SPME (Solid-Phase Microextraction): Micro-Extração em Fase Sólida
- t-Bu: terc-butil
- TGA (Thermogravimetric Analysis): Análise Termogravimétrica
- TLC (Thin-Layer Chromatography): Cromatografia em Camada Delgada
- UV: ultravioleta
- UV-Vis: ultravioleta-visível
- UVPD (UV Photolysis Digestion): Digestão por Fotólise em UV
- WHO: World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

1. *INTRODUÇÃO*

Contextualização do Problema

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

Apesar do conflito de opiniões, inclusive na mídia, entre toxicidade e a necessidade de utilização dos pesticidas, e enquanto novas tecnologias como a dos transgênicos e a biorremediação de solos não estão bem estabelecidas e nem são consensuais, observa-se um constante aumento no emprego de herbicidas, fungicidas, inseticidas e outros praguicidas na agricultura brasileira e mundial. A ação dos pesticidas sobre os produtos agrícolas é de importância vital na estrutura atual de produção de alimentos, mantendo as altas produtividades. Mesmo com todos os esforços realizados a fim de se desenvolver métodos alternativos de controle de pragas, como o controle biológico, nada indica que num curto prazo de tempo os pesticidas sejam substituídos por técnicas de pequeno impacto à saúde e ao ambiente.

Em face ao cenário atual, torna-se cada vez mais necessário o desenvolvimento de instrumentos de monitoração dos níveis de resíduos de pesticidas nos alimentos, nas pessoas, nos solos e nas águas, a fim de que sejam permanentemente controladas a qualidade ambiental e a saúde pública. Tal monitoramento tem também forte interesse com relação ao comércio exterior, já que uma importante fração da produção agrícola brasileira é destinada a mercados externos.

Fruticultura

O Brasil é um dos três maiores produtores mundiais de frutas, com uma produção que supera as 34 milhões de toneladas. A base agrícola da cadeia produtiva das frutas

abrange 2,2 milhões de hectares, gera 4 milhões de empregos diretos e um PIB agrícola de US\$ 11 bilhões [1]. A fruticultura brasileira responde por cerca de 5% das áreas cultivadas no país, representando importantes divisas para o país, e é uma das atividades capazes de assegurar ao Brasil o primeiro lugar no *ranking* dos produtores de frutas *in natura*. Segundo dados oficiais, o Brasil produziu no ano de 2001, 951 mil toneladas de uvas de mesa (21 mil toneladas exportadas) e 3 milhões de toneladas de tomate (12 mil toneladas exportadas) [2]. Somente no Vale do São Francisco, a produção de uvas de mesa é de 240 mil toneladas/ano (20 mil toneladas exportadas) [3].

Entretanto, este imenso potencial será comprometido se não for adequado à nova realidade que surge, através do acompanhamento dos resíduos de pesticidas nos produtos agrícolas exportáveis e sua comparação com normas nacionais e internacionais de defesa fitossanitária.

Com a intensa aplicação de agrotóxicos nas principais culturas de irrigação, alguns problemas têm surgido, tais como: salinidade do solo e da água, ocorrência de doenças e pragas, contaminação da água e do homem e baixa produtividade das culturas. Devido à importância do controle químico para a agricultura, surge a necessidade de se monitorar os principais problemas surgidos com relação ao uso de pesticidas, com a finalidade de sugerir estratégias para evitar o problema de resistência e contaminação ambiental.

Pesticidas

O Decreto Federal nº 4074, de 04 de janeiro de 2002, define como "agrotóxicos e afins" todos os "*produtos e agentes de processos físicos, químicos e biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento*" [4].

Os pesticidas, também chamados de praguicidas, são em geral compostos orgânicos que são o princípio ativo dos defensivos agrícolas. Os pesticidas se

classificam em várias classes, segundo sua ação ou uso. A tabela 1 mostra os principais grupos e classes químicas de pesticidas.

Tabela 1: Principais classes de pesticidas

Grupo e função	Classes
Inseticidas (controle de insetos)	- Carbamatos - Organofosforados - Organoclorados - Benzoiluréias substituídas - Organometálicos
Fungicidas (controle de fungos)	- Ftalimidas - Benzimidazóis - Imidazóis - Acilalaninas - Ditiocarbamatos - Dicarboximidas - Inorgânicos (sulfato de cobre)
Herbicidas (controle de ervas daninhas)	- Triazinas - Uréias - Uracilas - Tiocarbamatos - Dinitrofenóis - Amidas substituídas - Bipiridínicos - Fenóis - Ácidos benzóicos - Ácidos fenoxialifáticos - Piridinas
Molusquicidas (controle de moluscos)	- Metaldeído
Acaricidas (controle de ácaros)	
Algicidas (controle de algas)	
Nematicidas (controle de nematóides)	
Rodenticidas (controle de roedores)	- Fosfito de zinco - Fósforo branco - Cumarina

Fonte: EPA - Environmental Protection Agency – Estados Unidos (www.epa.gov); acesso em 22/08/2002

Idealmente, os pesticidas devem exercer uma ação tóxica específica para um dado organismo alvo [5]. Há casos onde a ação é específica, como por exemplo os herbicidas sistêmicos, que atuam através da seiva das plantas. Porém, na maioria das vezes, eles não apresentam a ação específica desejada e atingem todo o ecossistema. Os pesticidas aplicados na lavoura e depositados no solo eventualmente são transportados para as águas superficiais através de vários mecanismos, causando

sua contaminação. Além disso, muitos pesticidas são persistentes e podem bioacumular no meio ambiente [6].

A figura 1 mostra a evolução no consumo de defensivos agrícolas no Brasil.

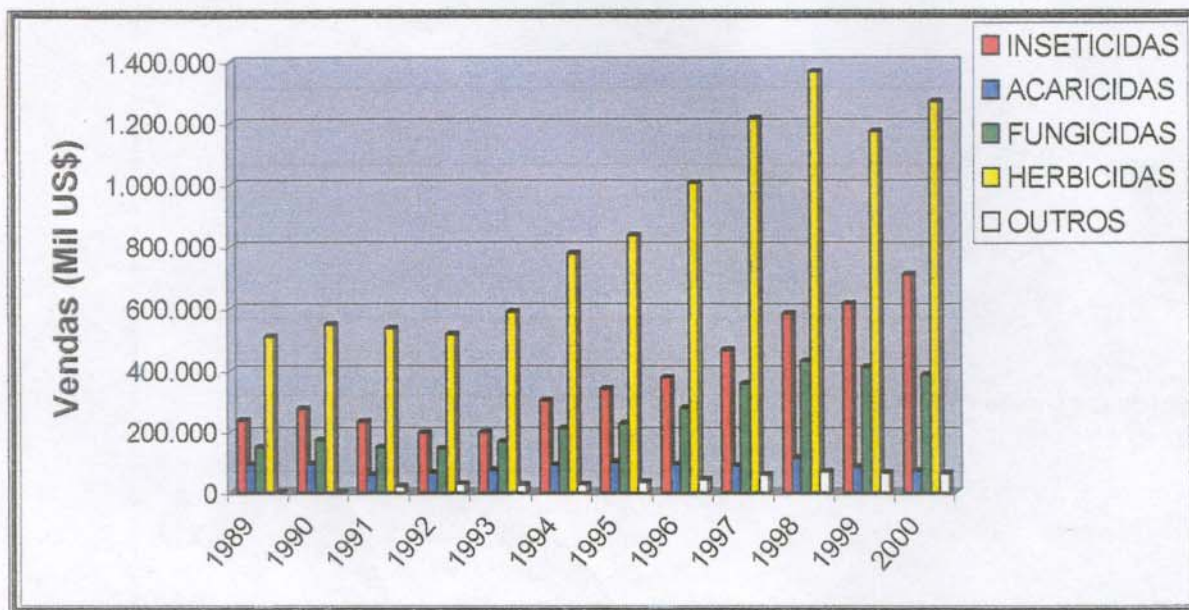


Figura 1: Evolução no consumo de defensivos agrícolas no Brasil

Fonte: SINDAG - Sindicato Nacional das Indústrias de Produtos para Defesa Agrícola (www.sindag.com.br); dados atualizados em 26/07/2002

Toxicologia

Pesticidas são compostos classificados como xenobióticos, compostos que, como os fármacos, têm a propriedade de ação tóxica em pequenas quantidades, porém apresentam efeitos tóxicos acima de uma determinada dose. Esse efeito foi relatado pela primeira vez no século XVI por Paracelso (1493 - 1541). Pode-se dizer que todo o trabalho que se faz hoje, com relação ao monitoramento de resíduos, tem como pano de fundo os estudos de Paracelso, buscando definir limites (doses) de xenobióticos que não causem danos à saúde e ferramentas para se investigar se estes limites estão sendo obedecidos.

Os pesticidas são em geral substâncias tóxicas, podendo sua utilização oferecer ou não perigo para o ser humano. A segurança que se pode ter em seu uso está diretamente relacionada com a toxicidade do composto, o grau de contaminação e o tempo de exposição a ele durante a aplicação. Produtos considerados pouco tóxicos, como os piretróides de uso doméstico, não são necessariamente inócuos

quando utilizados de forma contínua e direta sobre seres humanos. Os principais problemas acarretados pelos pesticidas são resultado de sua utilização indiscriminada [7].

A contaminação por pesticidas se dá de forma direta ou indireta [7]. A primeira é consequência da exposição excessiva das pessoas que trabalham com estas substâncias. A forma indireta resulta da exposição da população aos pesticidas, seja por causa de acidentes, seja pela contaminação do ambiente por resíduos industriais ou por consequência de aplicações pouco criteriosas ou ainda por contaminação dos produtos de consumo.

A toxicidade dos pesticidas pode ser compreendida através das suas características físico-químicas. Os pesticidas organoclorados, por exemplo, apresentam elevada estabilidade química, baixa solubilidade em água e baixa volatilidade à temperatura ambiente [8], efeitos que os tornam uma categoria de difícil degradação, de fácil acumulação em tecidos e potenciais contaminantes de ar e solos. A OMS (Organização Mundial de Saúde) recomenda a classificação por periculosidade dos pesticidas em classes, segundo os valores de LD₅₀ (dose letal mediana) em camundongos, ou seja, a dose a partir da qual se observa a morte de 50% dos animais de uma população exposta.

A tabela 2 mostra a classificação dos pesticidas por periculosidade, segundo a recomendação da OMS.

Tabela 2: Classificação dos pesticidas por periculosidade, segundo recomendação da OMS [9]

Classe	LD ₅₀ para camundongos (mg kg ⁻¹ massa corpórea)	
	Sólidos	Líquidos
Ia – periculosidade extrema	≤ 5	≤ 20
Ib – periculosidade alta	5 – 50	20 – 200
II – periculosidade moderada	50 – 500	200 – 2000
III – baixa periculosidade	> 500	> 2000
III* – não apresenta periculosidade em uso normal	> 2000	> 3000

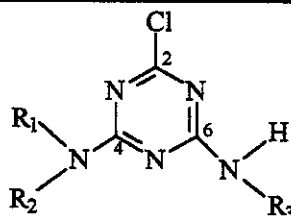
Nas tabelas 3 a 6 e na figura 2 são apresentadas algumas características físico-químicas e toxicológicas dos pesticidas estudados neste trabalho.

Tabela 3: Pesticidas estudados

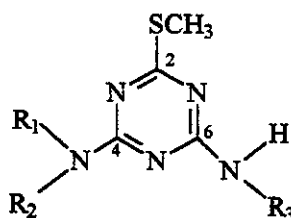
Tipo	Nome	Classe
Herbicidas	Atrazina	Triazinas
	Ametrina	
	Simazina	
	Diuron	Uréicos
	Tebutiuron	
Fungicida	Benomil	Benzimidazol

Triazinas

As triazinas representam um importante grupo de herbicidas, amplamente empregado na agricultura há mais de duas décadas como herbicidas de pré e pós-colheita. Os herbicidas são compostos, em geral, menos tóxicos do que a maioria dos inseticidas porque atuam em processos bioquímicos importantes para os vegetais, mas inexistentes nos animais. As triazinas, por exemplo, atuam na inibição de processos de fotossíntese.



Triazina	R ₁	R ₂	R ₃
Simazina	H	Et	Et
Atrazina	H	Et	<i>i</i> -Pr
Propazina	H	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr
Terbutilazina	H	Et	<i>t</i> -Bu
Cianazina	H	Et	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{C}-\text{CN} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$

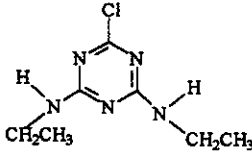
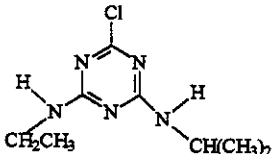
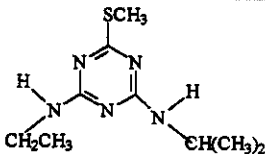


Triazina	R ₁	R ₂	R ₃
Ametrina	H	Et	<i>i</i> -Pr
Prometrin	H	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr
Terbutrin	H	Et	<i>t</i> -Bu

Figura 2: Estruturas de algumas triazinas (Et= etil; *i*-Pr= isopropil; *t*-Bu= terc-butil) [10]

A atrazina, um dos principais herbicidas da classe das triazinas, apresenta atividade carcinogênica, levando até meses para se degradar, após sua aplicação no solo. A atrazina foi banida recentemente em alguns países europeus, como Alemanha e Itália [11].

Tabela 4: Características físico-químicas e toxicológicas das triazinas estudadas [11,12]

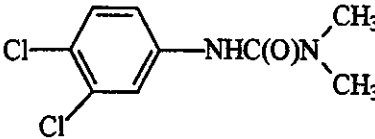
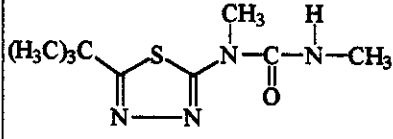
	Simazina	Atrazina	Ametrina
Estrutura			
Fórmula molecular	$C_7H_{12}ClN_5$	$C_8H_{14}ClN_5$	$C_9H_{17}N_5S$
Massa molar ($g\ mol^{-1}$)	201,66	215,69	227,33
Classe toxicológica (EPA)	III (fracamente tóxico)	III (fracamente tóxico)	III (fracamente tóxico)
LD ₅₀ (camundongos) ($mg\ kg^{-1}$)	971	1750	1100

Diuron / Tebutiuron

O uso dos herbicidas derivados de uréia tem crescido parcialmente pela sua capacidade de substituir as triazinas, sendo menos persistentes no ambiente.

Esta classe de pesticidas é de difícil análise através de cromatografia gasosa devido à sua alta instabilidade térmica, resultando em isocianatos e aminas alifáticas. As análises por HPLC podem ser realizadas diretamente [13].

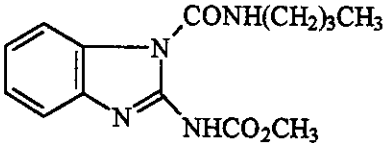
Tabela 5: Características físico-químicas e toxicológicas do diuron e tebutiuron [11,12]

	Diuron	Tebutiuron
Estrutura		
Fórmula molecular	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$	$C_9H_{16}N_4OS$
Massa molar ($g\ mol^{-1}$)	233,10	228,32
Classe toxicológica (EPA)	III (fracamente tóxico)	III (fracamente tóxico)
LD ₅₀ (camundongos) ($mg\ kg^{-1}$)	3400	644

Benomil

O benomil é um dos fungicidas sistêmicos mais eficientes e é amplamente empregado na agricultura. Pertencente ao grupo benzimidazol, controla grande variedade de doenças agrícolas, sendo amplamente aplicado no tratamento pós-colheita, em frutas que serão armazenadas durante determinado período, sob certas condições de temperatura e umidade relativa. O benomil é utilizado com a finalidade de preservar frutas destinadas à exportação, durante o tempo correspondente ao embarque, transporte, desembarque e comercialização no país de destino [14].

Tabela 6: Características físico-químicas e toxicológicas do benomil [11,12]

Benomil	
Estrutura	
fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃
massa molar (g mol ⁻¹)	290,32
classe toxicológica (EPA)	IV (praticamente atóxico)
LD ₅₀ (camundongos) (mg kg ⁻¹)	9590

Legislação

A regulamentação quanto ao uso dos defensivos agrícolas está baseada não só no controle das classes químicas dos princípios ativos autorizados para uso como pesticidas, mas também no estabelecimento de nível de referência, que corresponde à quantidade máxima de resíduo de determinado pesticida que pode ser aceita em cada alimento, quando destinado ao consumo humano [15,16]. Em tese, o cumprimento destes Limites Máximos de Resíduos (MRL), permite preservar a saúde do consumidor da ação tóxica destes compostos. Neste sentido, diversos organismos nacionais e internacionais estão encarregados de estabelecer tais limites. Em 1962 foi criada, em nível internacional, a Codex Alimentarius Commission, um organismo da ONU, subsidiário da FAO (Food and Agriculture Organization) e da OMS, encarregado de proteger a saúde dos consumidores. Atualmente, mais de 150 nações participam do Codex. A contribuição do Codex, de particular relevância, é o estabelecimento dos valores de MRL recomendados, e que podem ser aceitos livremente pelos países

membros.

Em geral, o assessoramento científico destes organismos internacionais tem sido efetuado pelo JMPR (Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues), que consiste num grupo de peritos em resíduos de pesticidas da OMS e de um painel de especialistas sobre resíduos de pesticidas em alimentos e no meio ambiente da FAO. Os peritos da FAO estimam os valores de MRL em diversos grupos de alimentos, para os pesticidas cujos valores de Ingestão Diária Aceitável (ADI) já tenham sido fixados pelo grupo de especialistas da OMS. Os valores estabelecidos pela JMPR são baseados em dados toxicológicos, enquanto que os MRL têm como base os métodos de utilização de pesticidas (Boas Práticas Agrícolas), refletindo a concentração residual obtida nos estudos de degradação dos compostos. Portanto, os valores de ADI e MRL referem-se a distintas bases de dados e estão convenientemente relacionados, de modo a assegurar que os pesticidas utilizados não apresentem nenhum risco à saúde dos consumidores. Para o cálculo destes valores de referência, parâmetros analíticos, como por exemplo, os limites de detecção das técnicas analíticas aplicadas, são levados em consideração.

Nos Estados Unidos, o organismo responsável pelo estabelecimento das tolerâncias é a EPA (*Environmental Protection Agency*), e o responsável pelo cumprimento dos limites fixados pela legislação é o FDA (*Food and Drug Administration*). O rígido controle estabelecido por tais organismos surgiu paulatinamente com os casos de contaminação por pesticidas em alimentos, que foram ainda mais pronunciados no final da década de 80. Tais órgãos contam com legislação própria, e os valores de referência estipulados têm sido frequentemente revistos, uma vez que os métodos analíticos têm se tornado cada vez mais eficazes ao longo dos anos.

Na Comunidade Européia existem diretrizes que estabelecem os MRL, e estas devem ser adotadas por todos os estados membros. Tais diretrizes variam conforme a classe dos pesticidas e os tipos de alimentos estudados. Cada estado membro da Comunidade Européia é encarregado de executar programas de inspeção para impedir que produtos de origem vegetal ou animal que contenham resíduos superiores aos conteúdos máximos estabelecidos sejam colocados no mercado. [15,17]

A importância dos MRL do Codex para o comércio internacional adquiriu dimensão maior desde a entrada em vigor, em 1995, do acordo sobre a aplicação de

medidas sanitárias e fitossanitárias da Organização Mundial do Comércio (OMC). O acordo baseia-se nas normas, diretrizes e recomendações do Codex. Desse modo, os MRL estabelecidos pelo Codex devem ser aceitos pelos estados membros e para que um governo rejeite a entrada de um alimento com os valores de MRL do Codex deverá justificar tecnicamente porque existe esta restrição para proteger os consumidores do país. Os estados membros do Codex enfrentam atualmente vários obstáculos que os impedem de harmonizar os seus limites com os do Codex. Para tal, foi criada a ICH (*International Conference on Harmonisation*), uma organização composta por representantes de órgão fiscalizadores da Europa, Japão e Estados Unidos, que tem por objetivo harmonizar as diferentes legislações existentes na área de análise de alimentos e fármacos, indicar e recomendar práticas a serem adotadas [18].

No Brasil, os MRL foram definidos como: *"quantidade máxima de resíduo de agrotóxico ou afim oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa em partes (em peso) do agrotóxico, afim ou seus resíduos por milhão de partes de alimento (em peso) (ppm ou mg/kg)"* [4]. O Brasil, como membro da ONU, a princípio segue as orientações do Codex. Casos específicos são estabelecidos através de portarias da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), publicadas no Diário Oficial [15,19].

Ações mitigatórias e alternativas ao uso de pesticidas

Além do aperfeiçoamento da legislação e dos mecanismos de controle fitossanitário, a comunidade científica e a sociedade têm desenvolvido ações que visam contornar os efeitos prejudiciais do uso de pesticidas. Estas ações se dão, principalmente, nas seguintes direções:

- **proibição dos pesticidas mais tóxicos:** [20] tem como principal ação os acordos firmados pelo Tratado de Estocolmo, em 2001, com objetivo de proibir os Contaminantes Orgânicos Persistentes (COP). Os COP são persistentes, ou seja, estáveis, resistindo aos processos naturais de decomposição, exercendo assim efeitos tóxicos ao meio ambiente durante muito tempo. Além disso, apresentam efeito de bioacumulação, concentrando-se nos tecidos lipídicos dos seres vivos. Estes efeitos, em seres humanos, podem levar a problemas endócrinos, infertilidade, deficiência cognitiva, alterações no sistema imunológico e outros. O Tratado de Estocolmo definiu

direcionamentos para a proibição da fabricação de novos COP e para a eliminação dos já existentes. Dentre os pesticidas, são considerados COP o aldrin, endrin, toxafeno, clordano, dieldrin, heptacloro, mirex e DDT.

- **desenvolvimento de novos pesticidas com menor impacto ambiental:** como exemplo, tem-se o caso de novos herbicidas, que são hidrossolúveis e apresentam ação em sistemas exclusivamente vegetais, como o fotossintético, e por isso, têm baixa toxicidade em humanos.

- **biorremediação de solos:** aplicação de microorganismos em solos contaminados por pesticidas. Alguns fungos e bactérias têm a propriedade de metabolizar determinados pesticidas. Uma das classes mais estudadas é a dos herbicidas uréicos, que inclui o diuron [21-23].

- **controle biológico de pragas:** tendência crescente, onde são aplicados alguns tipos de vírus, bactérias e insetos no combate a agentes nocivos às plantações. Por exemplo, na região sul do Brasil, cerca de 1,2 milhão de hectares de soja (10% da área total de plantio no país) utilizam o vírus *Baculovirus anticarsia* no combate à lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*). Para o combate da broca-da-cana, o agricultor pode usar vespas do gênero *Cotesia*. Na citricultura, as vespas *Agonaspis citricola* ajudam a combater a incidência de cancro cítrico nos pomares paulistas. A joaninha é predadora natural de cochonilhas e alguns tipos de bactérias combatem a praga do algodão [24]. Recentemente a ação fungicida da quitosana, um abundante biopolímero natural, tem sido estudada e aplicada na proteção de frutos pós-colheita [25-27].

- **transgênicos:** trata-se de uma das ferramentas biotecnológicas que é aplicada ao desenvolvimento de novos alimentos, através da sua modificação genética. Polêmica e de consequências ainda pouco conhecidas, a tecnologia dos transgênicos é amplamente defendida e criticada. Os defensores dos transgênicos afirmam a capacidade de se desenvolver alimentos com maior resistência às pragas e doenças, às condições climáticas adversas, maior tolerância aos herbicidas, melhoramento dos constituintes nutricionais, maior facilidade de processamento, melhor conservação dos frutos, além da produção ou aumento de determinadas substâncias com alguma função especial (alimentos funcionais) e aumento da produtividade. Os críticos da nova tecnologia alertam para os perigos que os transgênicos podem trazer para a biodiversidade, uma vez que estas espécies mais

resistentes teriam uma grande vantagem nos processos de seleção natural. O desenvolvimento de espécies resistentes a fungos e insetos poderia, por um lado, eliminar também insetos e fungos benéficos, causando um desequilíbrio na cadeia biológica. Por outro lado, poderiam estimular a evolução de insetos e pragas mais resistentes, criando assim "super-insetos" [28-29].

Análise Química de Pesticidas

Desde a década de 1960, quando o monitoramento dos níveis de pesticidas em frutas foi recomendado, mais de 380 compostos foram investigados. Atualmente, centenas de pesticidas são analisados em frutas [30]. Estes pesticidas apresentam uma ampla variedade de usos e de propriedades físico-químicas. Mesmo dentro de cada grupo de pesticidas, os diferentes compostos apresentam diversidade com relação ao uso.

As principais técnicas para análise de pesticidas são a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) [31-33] e a Cromatografia Gasosa (GC) [31,34]. Em geral, as duas técnicas se complementam; como a GC requer que as amostras tenham estabilidade térmica e alta volatilidade, ela é empregada primordialmente às classes de pesticidas que apresentam estas características, como os inseticidas organoclorados e organofosforados. A HPLC, devido a sua versatilidade, é aplicada a uma gama mais ampla de classes de pesticidas, especialmente os herbicidas, fungicidas e inseticidas carbamatos.

A maioria das metodologias existentes para determinação de resíduos de pesticidas por HPLC está baseada na análise unirresidual ou na determinação de alguns pesticidas de uma mesma classe.

Outras técnicas analíticas também aplicadas à análise de pesticidas atualmente, em menor escala ou em fase de desenvolvimento, são a Cromatografia em Camada Delgada [35], a Eletroforese Capilar [36] e os ensaios imunoenzimáticos [37-39].

Independente da técnica de separação empregada, a análise de pesticida, em geral, compreende as etapas de extração do analito da matriz, remoção de interferentes que são extraídos conjuntamente, separação, identificação e quantificação das espécies de interesse. [40].

Análise Multirresíduo

Os métodos de análise cromatográfica de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais reportados na literatura científica internacional podem ser classificados em três categorias: **a)** determinação de resíduos isolados (ou métodos unirresiduais), incluindo ou não seus metabólitos; **b)** análise multirresíduo de pesticidas de uma mesma classe e **c)** análise multirresíduo de classes diferentes. Esta última categoria é denominada por alguns autores como análise *multiclasse*.

Os métodos de análise unirresiduais [14,41-52] geralmente não exploram toda a potencialidade que as técnicas cromatográficas oferecem. Por serem menos suscetíveis à interferência de outros analitos e mais fáceis de serem estabelecidos, são utilizados especialmente para o estudo do comportamento químico da substância em estudo, como por exemplo, a sua degradação e metabolismo frente a diferentes condições.

Já os procedimentos de análise multirresíduo de pesticidas de uma mesma classe [53-69], necessitam de maiores recursos que as técnicas cromatográficas dispõem (como, por exemplo, detecção simultânea em vários comprimentos de onda e eluição no modo gradiente) e tem um enfoque mais voltado para análise quantitativa e qualitativa dos resíduos nas amostras, sendo uma importante ferramenta, por exemplo, para o mapeamento toxicológico em uma determinada área, ou grupo de pessoas, ou para a inspeção sanitária de produtos de exportação. A cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos (LC-DAD) é bastante empregada nesse tipo de análise [53,54,56,59,62].

Os métodos de análise multirresiduais de pesticidas de classes diferentes [35,70-86] exigem dos sistemas cromatográficos, detectores que forneçam resposta simultânea à analitos com diferentes características físico-químicas. Para atingir tal objetivo, a técnica mais desenvolvida e disponível atualmente é a cromatografia gasosa, devido ao grau de desenvolvimento de seus detectores. Por isso, a imensa maioria dos trabalhos em análise multiclasse de pesticidas em frutas e vegetais emprega a cromatografia gasosa com detectores de espectrometria de massas, captura de elétrons e nitrogênio-fósforo [69,70,72-76,78-83,85-86]. Estudos de determinação multiclasse de pesticidas em frutas aplicando a cromatografia líquida não constavam da literatura até há pouco tempo. Os avanços no desenvolvimento do espectrômetro de massas como detector para HPLC (LC-MS) prometem dinamizar os

estudos nessa área. Sua aplicação, inicialmente, foi direcionada a outras matrizes [24,87-89]. Recentemente, têm sido reportadas pesquisas sobre análise de pesticidas de diferentes classes em frutas e vegetais, empregando LC-MS e a Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD) como técnica de preparo de amostra. [90,91]

A tabela 7 mostra um sumário de um grupo significativo de trabalhos publicados na literatura, envolvendo a determinação de pesticidas em matrizes de frutas e vegetais. Pode se observar que há uma diversidade grande, tanto com relação à técnica cromatográfica empregada, quanto ao método de *clean-up*. Alguns trabalhos têm como foco o monitoramento de uma grande quantidade de amostras durante um intervalo de tempo que pode chegar a ser de alguns anos. Nestes casos, alguns artigos descrevem a validação das metodologias que serão empregadas para a execução do trabalho de monitoramento.

Tabela 7: Sumário de uma seleção de artigos envolvendo determinação de pesticidas em frutas e vegetais

Ref.	Pesticida	Matriz	Comentário	Solvente de Extração	Clean-up	Sistema Cromatográfico	Fortificação	Recuperação (%)
14	Benomil (fungicida)	Manga	Estudo de degradação do benomil (proteção antifúngica pós-colheita) simulando condições de transporte (exportação)	AcOEt	LLE (HCl 2 mol L ⁻¹ + CHCl ₃)	HPLC-UV	0,3-1 mg kg ⁻¹	65-117
35	Atrazina, Diuron, Cloroxuron, Metribuzin	Tomate	Análise multiclasse por cromatografia em camada delgada (TLC)	AcOEt	GPC	TLC GC e HPLC (para confirmação)	8-16 µg kg ⁻¹	80-87
41	Carbendazim (fungicida)	Uva	-	Hexano:AcOEt (1:1, v/v)	Secagem em Na ₂ SO ₄	HPLC-UV	0,5-5 mg kg ⁻¹	76-101
42	Clomequat Mepiquat (herbicidas)	Pera Tomate Farinha de trigo	-	MeOH:H ₂ O (1:1)	SPE on-line (resina troca catiônica forte)	HPLC-MS-MS	19-31 µg kg ⁻¹	-
44	Abamectin (inseticida e acaricida)	Maça Pera Tomate	-	CH ₃ CN	SPE (C18)	HPLC-fluorescência	10-50 µg kg ⁻¹	88-106
45	Metomil (inseticida)	Tomate Feijão-verde	Estudo da degradação de metomil em tomate e feijão-verde cultivados em estufa	MeOH + CH ₂ Cl ₂ (LLE)	Coluna de Florisil	HPLC-UV	0,03-0,40 mg kg ⁻¹	83-87
47	Benomil (fungicida)	Morangos	-	AcOEt	LLE (HCl 2 mol L ⁻¹ + AcOEt)	HPLC-UV	0,5-1,0 mg kg ⁻¹	70-106
53	Acetamiprid Imidacloprid Nitenpiram (inseticidas)	Pepino Batata Tomate Uva	Determinação de nova classe de inseticidas (neonicotinóides)	CH ₃ CN	SPE (cartuchos de troca aniônica fraca + sílica)	HPLC-DAD	0,2-2,0 mg kg ⁻¹	64-90

Ref.	Pesticida	Matriz	Comentário	Solvente de Extração	Clean-up	Sistema Cromatográfico	Fortificação	Recuperação (%)
55	Metamidofós Acefato Malation Paration metílico (inseticidas)	Tomate	Utilização de carvão ativo como material para SPE na determinação de inseticidas organofosforados	AcOEt	SPE (carvão ativo)	GC-NPD	0,2-0,6 µg kg ⁻¹	85-100
56	Diiflubenuron Triflumenuron Teflubenuron Lufenuron Flufenoxuron (inseticidas benzoiluréia)	Uva Vinho	-	AcOEt	SPE (sílica para uvas e C18 para vinhos)	HPLC-DAD	0,02-2,0 mg kg ⁻¹ 0,01-0,2 mg L ⁻¹	85-101 69-105
57	Carbendazim Tiabendazol Imalazil Procloraz (fungicidas benzimidazol/canazol)	Laranja	-	Acetona + CH ₂ Cl ₂ + éter de petróleo (LLE)	SPE (diol)	HPLC-fluorescência	0,1-5,0 mg kg ⁻¹	76-105
57	17 herbicidas uréicos	Cenoura Batata Pepino Maça Cogumelo Repolho	-	Acetona + CH ₂ Cl ₂ /éter de petróleo (LLE)	SPE (aminopropil)	HPLC-fluorescência	0,1-0,5 mg/kg	47-110
58	9 herbicidas uréicos	Batata, cenoura e vegetais mistos	-	Acetona + AcOEt/ciclohexano (LLE)	GPC + SPE (florisil)	HPLC-UV	0,01-0,1 mg kg ⁻¹	70-98
59	5 inseticidas N-metil-carbamato	Batata Cenoura	Estudo de vários procedimentos de <i>clean-up</i>	MeOH + CH ₃ CN/éter de petróleo (LLE)	Sílica Alumina Florisil Celite-carvão silanizado C18 (SPE) C8 (SPE) Ciano (SPE)	HPLC-UV	-	84-120
62	6 herbicidas uréicos	Cenoura alho, milho, uva, cebola, batata, morango	Uso de cromatografia por imunofinidade como técnica de <i>clean-up</i>	MeOH	Imunofinidade + SPE troca aniônica forte	HPLC-UV	25 µg kg ⁻¹	37-103
64	Carbendazim Tiabendazol (fungicidas benzimidazolícos)	27 espécies de vegetais e frutas	Utilização de SPE on-line para monitoramento de frutas e vegetais na Holanda entre 1992 e 1994	Acetona + CH ₂ Cl ₂ /éter de petróleo (LLE)	SPE (diol)	HPLC-fluorescência	0,1-1,0 mg kg ⁻¹	97-107
65	21 inseticidas N-metil-carbamatos e 12 de seus metabólitos	Dezenas de espécies de vegetais e frutas	Utilização de SPE on-line para monitoramento de frutas e vegetais na Holanda entre 1987 e 1991	Acetona + CH ₂ Cl ₂ /éter de petróleo (LLE)	SPE (aminopropil)	HPLC-fluorescência	0,13 mg kg ⁻¹	18-102
67	8 inseticidas N-metil-carbamatos	Dezenas de espécies de fruta e vegetais	-	Acetona	SPE (aminopropil)	HPLC-fluorescência	0,05-5 mg kg ⁻¹	80-105
70	8 inseticidas de diferentes classes	Laranja Maça Tomate Cenoura Alcachofra	Análise multiclasse empregando MSPD	AcOEt	MSPD (C18)	GC-NPD GC-ECD GC-MS	0,05-10 mg kg ⁻¹	62-102

Ref.	Pesticida	Matriz	Comentário	Solvente de Extração	Clean-up	Sistema Cromatográfico	Fortificação	Recuperação (%)
71	13 inseticidas e fungicidas	Maçã Laranja Pera Tomate Alface Páprica	Comparação das técnicas de SPE e MSPD no <i>clean-up</i> de amostras	AcOEt (MSPD/C18) Tolueno (MSPD/carvão) Acetona:H ₂ O (1:1) (SPE)	MSPD (C18 e carvão ativo) SPE (C18 e carvão ativo)	GC-ECD GC-MS	-	40-107 (MSPD) 25-92 (SPE)
72	8 fungicidas de diferentes classes	Tomate Pimenta Feijão verde Pepino Melão Melancia	Estudo de efeitos da matriz	CH ₂ Cl ₂	Secagem em Na ₂ SO ₄ e filtração	GC-ECD	0,1-1,0 mg L ⁻¹	45-273 (calibração normal) 97-103 (calibração na matriz)
73	31 pesticidas de diferentes classes	Tomate Pimenta Feijão verde Pepino Melão Melancia Berinjela	Análise de 8000 amostras entre 2000 e 2001 na Espanha	CH ₂ Cl ₂	Secagem em Na ₂ SO ₄ e filtração	GC-MS-MS	7-300 µg kg ⁻¹ (pepino)	71-119 (pepino)
74	20 inseticidas organoclorados e piretróides	Maçã Pêssego Kiwi, Pera, Morango Melão Cereja Laranja	Estudo com frutas liofilizadas e análise de 100 amostras de frutas	Hexano	SPE (silica)	GC-ECD GC-MS	6-100 µg kg ⁻¹ (pêssego)	70-97 (pêssego)
75	28 pesticidas de 8 classes diferentes	Pera Batata Repolho	-	Acetona: CH ₂ Cl ₂ (3:1) – extração em solvente acelerado	SPE (florisil e C18)	GC-MS	0,02-0,60 mg kg ⁻¹	39-147
79	36 pesticidas de classes diferentes	Alface Batata Morango Maçã	Comparação das técnicas de GPC e SPE (polímero) para <i>clean-up</i>	AcOEt	GPC e SPE (poliestireno-divinilbenzeno)	GC-ECD GC-MS	0,2 mg kg ⁻¹	73-169 (SPE + GC-MS)
84	21 pesticidas entre N-metil-carbamatos, triazinas e feniluréicos	Feijão-verde	-	Acetona + CH ₂ Cl ₂ (LLE)	SPE (C18 e florisil)	HPLC-UV	0,4-2,0 mg kg ⁻¹	70-110
85	36 pesticidas de classes diferentes	Pera Cenoura Banana Maçã Morango Laranja Abacaxi Aspargo e outros	-	CH ₃ CN	Carvão-celite	GC-MS HPLC-fluorescência	0,1-0,5 mg kg ⁻¹	-
90	Dicloran, flutriafol, o-fenilfenol, procloraz, tolclofos-metil (fungicidas)	Cebola Pimenta Banana Limão Laranja	Monitoramento de 200 amostras de frutas e vegetais	CH ₂ Cl ₂	MSPD (C18)	LC-MS	0,01-10 mg kg ⁻¹	-

Preparo de Amostras

A determinação de pesticidas em baixas concentrações por HPLC envolve uma ou mais etapas de preparação da amostra utilizando sistemas de extração e pré-concentração, que visam isolar e concentrar os analitos de interesse a serem determinados. A tabela 8 mostra as principais técnicas de preparo de amostra empregadas atualmente e em desenvolvimento [92,93].

Tabela 8: Principais técnicas de preparo de amostra [92,93]

Tipo	Técnica
Digestão de amostra	- Digestão em Microondas - Digestão por Fotólise em UV (UVPD)
Extração por solventes	Empregando amostras líquidas: - Extração Líquido-Líquido (LLE) - Micro-Extração Líquido-Líquido (LLME) Empregando amostras sólidas: - Extração em Soxhlet - Extração por Fluido Pressurizado (PFE) - Extração por Fluido Supercrítico (SFE) - Extração Assistida por Microondas (MAE)
Extração em sorventes	- Extração em Fase Sólida (SPE) - Micro-Extração em Fase Sólida (SPME) - Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD) - Extração por Sorção em Barra Magnética (SBSE) - Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)
Separação através de membranas	- Diálise - Extração em Membranas

As técnicas mais utilizadas são a Extração Líquido-Líquido (LLE) e a Extração em Fase Sólida (SPE). Geralmente se utiliza uma das duas técnicas de extração, porém se a complexidade da matriz for alta, elas podem ser empregadas sequencialmente, num mesmo procedimento.

Extração Líquido-Líquido

A LLE, devido ao fato de ser uma técnica operacionalmente simples e estabelecida há mais tempo, ainda é muito recomendada pelos métodos padrões de análise, sendo uma das técnicas oficiais de preparo de amostras recomendada pelo FDA, órgão fiscalizador das áreas alimentícia e farmacêutica nos Estados Unidos [94]. Se baseia na partição dos analitos entre uma fase aquosa e um solvente orgânico de baixa polaridade [95] e apresenta desvantagens, como a formação de emulsões, a necessidade de grandes volumes de solvente (muitas vezes tóxicos e inflamáveis), longo tempo de extração, dificuldade de mecanização e maior risco de erros operacionais, devido a contaminação da vidraria, por exemplo.

Extração em Fase Sólida

A SPE é uma técnica de extração que tem se popularizado, devido ao fato de ser rápida, de menor custo, consumir menores volumes de solvente e de amostra e ser de fácil mecanização. Permite a limpeza das amostras (*clean-up*), a extração dos analitos e a pré-concentração de traços em soluções muito diluídas, como água, para gerar concentrações de analito em níveis detectáveis [95-97]. A realização destes procedimentos através da SPE substitui técnicas tradicionalmente utilizadas para este fim, como a extração líquido-líquido e *clean-up* através de coluna de cromatografia líquida de baixa pressão, que são procedimentos mais trabalhosos, consumindo grandes volumes de solventes orgânicos, de difícil mecanização e com baixos níveis de repetibilidade e reprodutibilidade.

A SPE é atualmente amplamente empregada em todo o mundo, sendo utilizada principalmente na preparação de amostras para análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Cromatografia Gasosa. A maioria das aplicações utilizando SPE está na determinação de traços de pesticidas em águas, solos, amostras biológicas, alimentos; determinação de traços de contaminantes orgânicos em águas; análises de efluentes industriais; isolamento de compostos orgânicos de águas; amostragem de poluentes em águas residuais; coleta e concentração de amostras ambientais em geral; pré-tratamento de amostras biológicas, como sangue e urina. A ampla gama de aplicações da SPE é possível devido à diversidade e versatilidade dos materiais contidos nos dispositivos de extração, permitindo diferentes modos de operação e diversos mecanismos de separação. Como limitações para a SPE pode ser citado o

alto custo de dispositivos comerciais multi-vias (*manifolds*), o custo dos dispositivos de extração, a falta de homogeneidade dos sorventes de mesma característica química entre os diferentes fabricantes, a impossibilidade de reaproveitamento dos cartuchos quando aplicados a matrizes complexas e, eventualmente, a dificuldade em selecionar o material correto para a aplicação desejada.

Modos de operação

Clean-up ou limpeza da amostra (adsorção)

O interesse principal é isolar o analito dos interferentes, tendo como objetivo secundário a pré-concentração. Geralmente é aplicada em amostras complexas (fluidos biológicos, alimentos, etc.) onde os constituintes da matriz podem interferir na análise. Um volume mínimo de amostra é introduzido na fase sólida (geralmente um material polar: sílica, aminopropil, etc.) e eluída com um solvente apolar; há a retenção dos interferentes (polares), passando os analitos apolares. A extração em fase sólida, no modo *clean-up*, é ilustrada na figura 3.

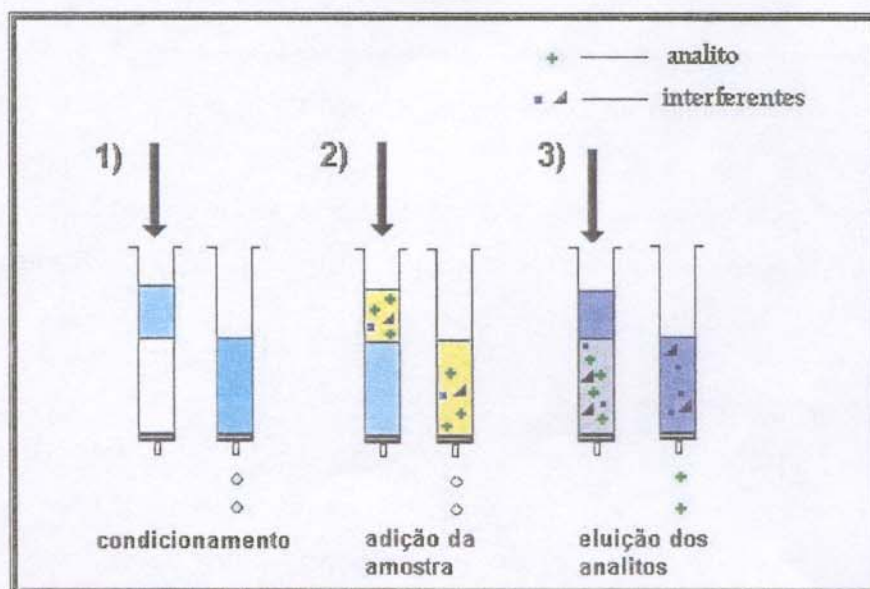


Figura 3: Extração em Fase Sólida; modo *clean-up*

Pré-concentração de analitos (partição)

Os analitos são aplicados, diluídos em um volume maior de solvente, através de uma fase sólida apolar (octadecil, octil, fenil, etc.); os analitos (apolares) ficam retidos, passando os interferentes (polares). Na sequência, um solvente de menor polaridade

retira os analitos retidos da fase sólida. Ao final, tem-se uma concentração bem mais alta que na amostra original, o que possibilita a sua detecção pelos instrumentos de análise química. Este modo de operação geralmente é aplicado para análises de águas. A extração em fase sólida, no modo pré-concentração, é ilustrada na figura 4.

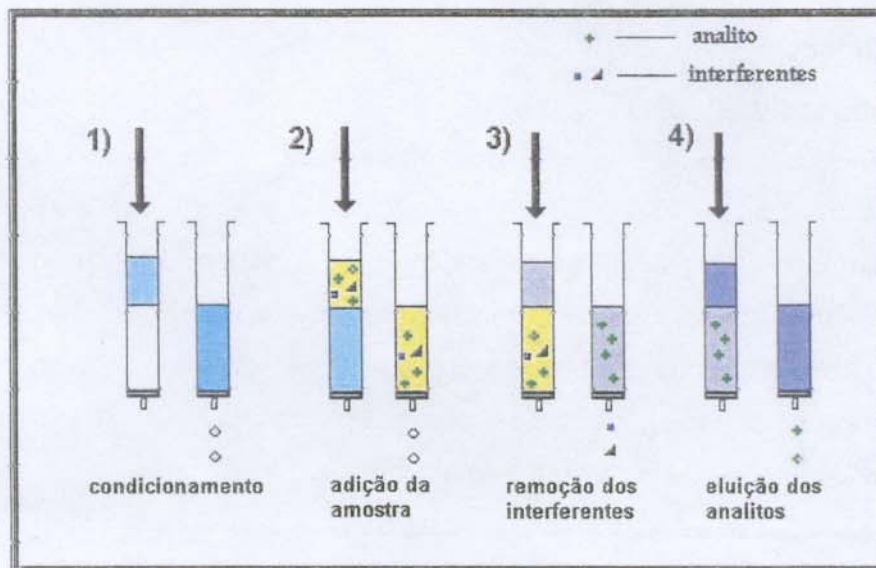


Figura 4: Extração em Fase Sólida; modo pré-concentração

Dependendo da complexidade da análise, pode ocorrer também que as etapas de pré-concentração e *clean-up* possam ser efetuadas simultaneamente em um mesmo procedimento de extração em fase sólida.

Estocagem de extratos de amostras

Empregado em análises de amostras que estão distantes do laboratório. Os cartuchos são transportados até o local e a amostra é passada através deles, retendo os analitos. Os cartuchos são levados, em condicionamento apropriado, até o laboratório, evitando o transporte de grandes volumes de amostra. Neste caso, torna-se necessário um estudo da estabilidade do analito durante o armazenamento no cartucho e o uso de temperatura adequada, para evitar perdas de analitos por volatilização.

Mecanismos de separação [24,95,97]

A técnica de Extração em Fase Sólida fundamenta-se nas cromatografias líquido-sólido e líquido-líquido e seus principais mecanismos de separação (adsorção, partição e troca iônica) baseiam-se na cromatografia líquida de baixa pressão.

A SPE utiliza materiais muito semelhantes às fases estacionárias de HPLC, porém com tamanho de partícula maior. Esses materiais são, na sua maioria, à base de sílica modificada com grupos octadecil (C18), octil (C8), amino (NH₂), ciano (CN) ou à base de resinas poliméricas, carbono grafitizado e alumina.

Adsorção

Dentre os suportes sólidos mais empregados como fase sólida para adsorção em SPE estão: sílica ((SiO₂)_n-OH), alumina ((Al₂O₃)_n) e florisil (Mg₂Al₂(SiO₄)₂(OH)₂). A sílica é o suporte mais popular e tem substituído o florisil, bastante utilizado no passado para a análise de pesticidas. A sílica possui uma superfície ligeiramente ácida, permitindo a retenção de compostos básicos, enquanto a superfície básica da alumina é apropriada para a adsorção de compostos ácidos. O florisil apresenta características polares. Um dos problemas com o uso da sílica em SPE é sua alta capacidade de adsorver água, através da formação de ligações de hidrogênio com os grupos silanóis de sua superfície. Ocorrendo isto, sua superfície será recoberta com moléculas de água e os sítios onde acontece a adsorção não estarão disponíveis.

Partição

A extração em fase sólida utilizando materiais preparados para apresentarem o mecanismo de partição é uma extensão natural das fases estacionárias similares empregadas em HPLC e visam evitar problemas de adsorção irreversível que ocorrem na utilização de sílica, alumina e outros materiais polares na análise de compostos altamente polares.

A grande maioria das fases empregando partição em SPE é preparada a partir de sílica. No caso mais comum, faz-se a sílica reagir com um derivado organoclorossilano, ligando o grupo alquil (R) do reagente à estrutura da sílica (fase quimicamente ligada). A figura 5 mostra o esquema da reação de síntese de uma fase sólida quimicamente ligada empregada em SPE.

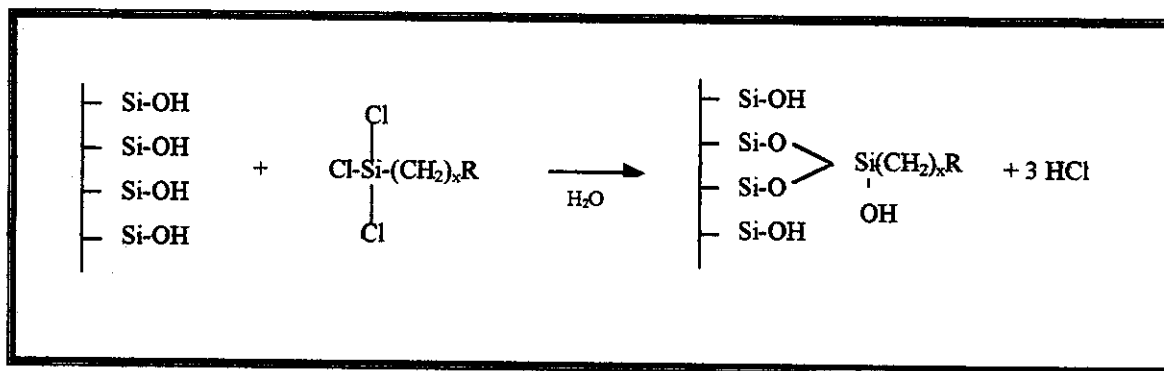


Figura 5: Exemplo de reação de modificação da sílica visando o preparo de fase quimicamente ligada

Neste exemplo, a reação pode ser com um, dois ou mais grupos funcionais, sendo chamada de modificação monofuncional, difuncional, etc. A escolha do grupo R definirá se a fase preparada será polar ($\text{R}=\text{OH}$, CN , NH_2 , etc.) e, portanto denominada "fase normal", ou apolar ($\text{R}=\text{C}_{18}$, C_8 , C_1 , etc.), denominada "fase reversa". No caso de fase reversa, quanto maior a cadeia do radical alquil, mais apolar será a fase, apresentando assim maior potencial para reter analitos apolares. De forma análoga a HPLC, os grupos silanóis ($\equiv\text{Si-OH}$) remanescentes na fase estacionária poderão ser sítios de adsorção e criar uma superfície heterogênea. Isto é usualmente resolvido através do tratamento com trimetilclorossilano, como em HPLC. O trimetilclorossilano é um reagente similar ao organoclorossilano utilizado na preparação da fase quimicamente ligada, porém com cadeia alifática $-\text{CH}_3$, de pequeno volume e que permite o acesso aos silanóis residuais. Esta reação terminal é chamada capeamento ou *end-capping* e visa reduzir os silanóis residuais.

As características da fase sólida podem diferenciar, dependendo do fabricante, do suporte, do tamanho de partículas, tamanho de poros, área superficial, além do grau de funcionalização e a presença ou ausência de *end-capping*, levando a uma imensa variedade de materiais disponíveis comercialmente.

A SPE empregando fase normal em sílica modificada (ciano, aminopropil, etc.), usualmente substitui a adsorção em extrações de solutos polares que podem sofrer adsorção irreversível e não serem eluídos do cartucho. A amostra é aplicada em um solvente de baixa polaridade e os analitos serão retidos em maior ou menor grau (dependendo de suas polaridades) na fase sólida. Em seguida, um solvente polar, como na adsorção, é aplicado para romper a interação do analito com a fase sólida

polar e eluir os analitos.

Na SPE empregando fase reversa, acontece o oposto: a fase móvel apresenta maior polaridade que a fase sólida, que retém os analitos menos polares presentes em solventes polares. Posteriormente, os analitos retidos serão eluídos com um solvente de baixa polaridade. Uma vez que o aumento do tamanho do radical aumenta o caráter apolar da fase sólida, em muitos casos o uso de fases do tipo octadecil (C18) pode acarretar em uma adsorção de analitos apolares maior que a desejada. Neste caso, empregam-se fases sólidas contendo radicais de cadeias menores como octil (C8) ou butil (C4), diminuindo a retenção.

Troca iônica

A troca iônica é geralmente empregada em SPE para o isolamento de analitos de caráter ácido ou básico presentes em solução aquosa. Os compostos básicos são usualmente retidos através de uma fase sólida consistindo de um trocador forte de cátions, do tipo $[\text{SO}_3^{2-}]$ ligado à estrutura da sílica, enquanto os compostos ácidos são retidos por trocadores fortes de ânions, do tipo $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$. Assim, ocorrerá uma forte atração entre analito e o trocador de íons de carga oposta. Quando estas interações forem muito fortes a ponto de dificultar a eluição dos componentes de interesse e tornar o tempo de extração maior que o desejado, trocadores iônicos mais fracos podem ser utilizados, apresentando menor retenção pelos compostos ácidos (fracamente aniônico) e básicos (fracamente catiônico).

Dispositivos

Na maioria das aplicações, os dispositivos de SPE mais empregados são os cartuchos (por alguns fabricantes denominados colunas ou tubos), nas formas de seringa ou barril. Um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno de 3 a 6 mL, contendo de 50 a 500 mg de sorvente, com tamanho de partícula variando de 40 a 60 μm , retidos no tubo através de dois filtros.

Outro tipo de dispositivo de uso crescente são os discos de extração, onde as partículas ativas são imobilizadas em uma matriz inerte e estável de microfibras de politetrafluoroetileno (PTFE) ou vidro [98,99]. Um disco típico tem 47 mm de diâmetro e 0,5 mm de espessura, contendo 500 mg de sorvente. Os diâmetros disponíveis variam de 4 a 90 mm e são definidos segundo o volume de amostra. Os discos possuem

vantagens como ter leito mais homogêneo, requisitar pressões menores durante a aplicação das amostras e na eluição, com ausência de caminhos preferenciais e possibilidade de utilizar vazões mais altas e menores volumes de eluentes na dessorção.

Fases sólidas a partir de polissiloxanos

Técnicas como a micro-extração em fase sólida (SPME) [100,101] e a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) [70,71,90,91,102,103], têm sido pesquisadas visando a redução de tempo de preparo de amostras, redução das quantidades de solvente e amostras empregadas e redução dos custos da análise. Estas técnicas também têm como base o uso de material sólido, geralmente a base de sílica modificada, para extração e pré-concentração dos componentes da amostra. São exemplos da importância da pesquisa de novos materiais que incrementem as técnicas citadas, além de contribuírem para o desenvolvimento da SPE.

A maioria das fases sólidas empregadas é do tipo C18, quimicamente ligadas (*bonded phases*), sintetizadas a partir da reação da sílica com um reagente organoclorossilano, que será responsável pelas características da fase sólida. Este tipo de reação, apesar das inúmeras vantagens que a consolidaram mundialmente na preparação de fases quimicamente ligadas para SPE e também para HPLC, apresenta desvantagens com relação ao custo dos reagentes organoclorossilanos; complexidade do procedimento de síntese, envolvendo grandes quantidades de solventes tóxicos, atmosfera inerte, temperatura; pureza dos reagentes e tempo despendido na síntese.

A sorção de polissiloxanos sobre sílica é pesquisada, com sucesso, em nosso grupo de pesquisas para obtenção de fases estacionárias para HPLC. Vários trabalhos de nosso grupo de pesquisas, utilizando este procedimento, já foram reportados na literatura científica [104-119]. O uso da sorção de polissiloxanos com terminações C18 sobre sílica, seguido de sua imobilização, para uso em dispositivos de extração em fase sólida [120], *on-line* e *off-line*, foi bem sucedido na análise de pesticidas em água e em urina [24,121,122] e também na pré-concentração de complexos metálicos [123]. O uso destes materiais C18 na análise de pesticidas em frutas ainda não foi reportado na literatura, assim como o uso das fases sólidas obtidas a partir da sorção e imobilização de polissiloxanos com terminações aminopropil sobre sílica. Este procedimento tem

como vantagens a simplicidade do processo de preparação dos materiais, menor número de etapas e menor custo, empregando materiais e reagentes disponíveis comercialmente.

Outros conceitos de fases sólidas [24,97]

Fases poliméricas

O principal material polimérico aplicado em SPE são os copolímeros poliestireno-divinilbenzeno. Eles se destacam pela elevada área superficial específica (700 a 1200 m² g⁻¹), estabilidade na faixa de pH 1-14 e maior capacidade de retenção de compostos polares do que as fases C18. Estes materiais podem também ser funcionalizados, com bons resultados de recuperação de compostos fenólicos em fases acetiladas e melhor adequação a amostras aquosas com fases sulfonadas.

Carbono grafitizado

São materiais com baixa resistência mecânica e por isso não são empregados em colunas de HPLC. Apesar disso, são materiais altamente homogêneos e com área superficial específica baixa (100-200 m² g⁻¹). Devido a sua estrutura cristalina, têm capacidade de atuar em SPE como fases do tipo reversa, com retenções superiores às obtidas em materiais C18.

Sorventes de modo misto (MMS – Mixed Mode Sorbents)

Os sorventes com modo misto de retenção contêm, na mesma estrutura, cadeias alquílicas (fases reversa) e ligantes que atuam como trocadores iônicos. São importantes para realizar, em uma única seqüência, a extração e o *clean-up* de matrizes biológicas (urina, sangue, plasma). Analitos ionizados sofrem uma interação forte com os sítios iônicos, possibilitando que a etapa de limpeza seja eficiente e sem grandes perdas. Em um segundo momento, troca-se o solvente, com um pH que permita o rompimento das interações iônicas entre analito e sorvente.

Fases de acesso restrito (RAM – Restricted Access Matrix)

São materiais desenvolvidos para análises biomédicas na determinação de analitos presentes em fluidos biológicos contendo compostos de alta massa molar, como proteínas. Estes materiais possuem uma superfície hidrofílica biocompatível na

parte externa e hidrofóbica no interior dos poros da partícula do sorvente. O mecanismo de separação é uma combinação de exclusão e partição: moléculas grandes, tais como as proteínas, não conseguem penetrar nos poros e eluem rapidamente, enquanto moléculas pequenas entram nos poros e são retidas seletivamente. Devido ao fato das substâncias húmicas presentes na água serem moléculas de alta massa molar, as fases de acesso restrito têm um grande potencial para esse tipo de aplicação.

Imunossorventes

São materiais que trabalham com o mesmo princípio da cromatografia por bioafinidade, baseada nas reações específicas entre antígeno e anticorpos. São materiais de alta seletividade e têm sido aplicados na análise de alguns pesticidas, como atrazina, clortoluron.

Polímeros impressos molecularmente (MIP – Molecularly Imprinted Polymers)

Os MIP são obtidos através da preparação de polímeros com sítios de reconhecimento sintéticos e têm uma seletividade pré-determinada para um ou mais analitos. Estes sítios de reconhecimento são obtidos pelo arranjo de monômeros funcionais polimerizáveis ao redor das moléculas do analito. Assim, são formados complexos através de interação molecular entre o analito e o monômero precursor. Os complexos são fixados através de reações de entrecruzamento de polímeros. A remoção do analito da matriz polimérica forma lacunas (sítios de reconhecimento) que irão exibir afinidade pelo analito. O potencial desse material (também chamado "anticorpo de plástico") é alto uma vez que oferece resistência à alta temperatura e à pressão e é inerte frente a condições extremas de acidez, alcalinidade, íons metálicos e solventes orgânicos.

Mecanização da SPE [95]

A extração em fase sólida pode ser conduzida nos modos *off-line* e *on-line*. No modo *off-line* as etapas de extração e concentração do analito são realizadas em um aparato independente do sistema cromatográfico. Após as etapas de pré-tratamento, a amostra é introduzida de modo convencional no sistema cromatográfico. O modo

off-line é o mais utilizado em SPE. Hoje em dia muitos equipamentos para extrações múltiplas são disponíveis comercialmente. Alguns deles fazem o processo de extração mecanicamente, mas a transferência da amostra para o injetor cromatográfico é manual (sistema mecanizado), enquanto outros são capazes de transferir a amostra automaticamente (sistema completamente automático). No sistema *on-line* as etapas de extração e concentração são realizadas no próprio sistema cromatográfico, onde são inseridos alguns acessórios.

Validação de Metodologias

O desenvolvimento de rotinas para a validação das metodologias tem crescido nos últimos anos, o que vai de encontro às exigências dos órgãos de fiscalização. Nesse aspecto, a maioria dos países tem estabelecido documentos oficiais que dão diretrizes a serem adotadas na validação de metodologias analíticas [17,94,124-135]. Na literatura científica, diversos trabalhos têm sido publicados discutindo os vários aspectos da validação e suas etapas [18,136-145].

A validação pode ser definida como sendo a confirmação, por exame e fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para um determinado uso pretendido pelo método de análise são atendidos. Assim, quando se desenvolve uma metodologia cromatográfica, devem ser realizados testes para verificar a sua confiabilidade, exatidão e precisão, de forma a confirmar sua adequação ao uso pretendido.

A otimização dos parâmetros de preparação da amostra e das condições cromatográficas é condição essencial para a obtenção de bons cromatogramas, com uma linha de base ausente de ruídos (que significa ausência de interferentes) e com uma boa separação de picos. Essas características são expressas pela **seletividade** (ou especificidade) do método, que é um dos poucos parâmetros de validação que não é expresso em números. A seletividade de um método é sua capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação numa mistura complexa. A seletividade é obtida em função do processo de preparação da amostra, sistema de detecção utilizado e da separação cromatográfica, através da identificação dos picos presentes nos cromatogramas (por exemplo, utilizando detector por arranjo de diodos ou o espectrômetro de massas) ou pela comparação

entre uma análise em branco da matriz e a matriz fortificada, sendo que nesse caso nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção dos analitos de interesse [24,124,126,144].

Os demais parâmetros de validação são expressos numericamente. A etapa de calibração do método envolve a curva analítica, cujos principais parâmetros são a linearidade e a sensibilidade.

A **linearidade** é a faixa ou intervalo de concentração no qual o sinal produzido pelo detector é diretamente, ou através de uma transformação matemática bem definida, proporcional à concentração dos analitos na amostra [17]. Através da curva analítica, geralmente obtida por regressão linear de primeira ordem ($y = a + bx$; onde a = coeficiente linear; b = coeficiente angular), a linearidade pode ser avaliada através da razão entre o sinal (S) e a concentração (C), definida por $(S/C)_i = (S_i - a)/C_i$, onde a razão sinal/concentração para um dado ponto i da curva analítica, $(S/C)_i$, é calculada a partir do sinal S_i , da concentração C_i correspondente e do intercepto do eixo y (a). Na ausência de erros determinados, ou seja, com coeficiente de correlação (r) igual a 1, a razão pode ser escrita como $(S/C)_i = b$ (onde b é a inclinação da curva) para todos os pares de dados experimentais utilizados para a construção da curva. Na presença de erros indeterminados ($r < 1$), que representa uma situação real, $(S/C)_i \sim b$. Se $(S/C)_i < b$ ou $(S/C)_i \gg b$, assume-se que os dados correspondentes estão fora da linearidade. Segundo a IUPAC, considera-se fora da linearidade pontos cujo valor sinal/concentração diferem em mais de 5% do valor de inclinação da curva [146,147].

O coeficiente angular da curva (b) representa a **sensibilidade** do método. Quanto maior o ângulo de inclinação da reta, maior será a variação do sinal em relação a pequenas variações de concentração e maior será a sensibilidade do método.

Calibração na matriz: O uso da calibração na matriz (MMC – *matrix-matched calibration*) em métodos cromatográficos é recente. Um dos primeiros trabalhos foi descrito por Johnson *et al.* [148], onde é avaliada a variação nos resultados de análise multirresíduo de herbicidas em vegetação, por GC-MS, comparando a calibração convencional (ou calibração com padrões externos) com a calibração na matriz. Recentemente, têm sido publicados na literatura estudos envolvendo calibração na matriz, aplicada à análise multirresíduo de pesticidas em frutas e vegetais por HPLC

[149,150].

A calibração na matriz tem por objetivo estabelecer um sistema de calibração onde o meio em que estão dissolvidos os padrões seja o mais semelhante possível à matriz da amostra. Para isso, o solvente na calibração na matriz é parcialmente constituído pelo próprio extrato da amostra, submetida a todo o processo de *clean-up* e pré-concentração [72].

Os interferentes da matriz que não são removidos podem mascarar parcialmente picos dos analitos ou serem identificados erroneamente como picos de analitos, gerando erros na quantificação dos compostos de interesse [81]. A calibração na matriz pode indicar estes efeitos da matriz e, em alguns casos, permitir que se estabeleça uma função matemática para correção da quantificação dos picos [72].

Limite de Detecção (LOD): o limite de detecção é a menor concentração ou quantidade do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, por um método analítico com um nível de confiança especificado, ou ainda, que pode ser estatisticamente diferente do ruído. É o ponto onde o valor da medida é maior que a incerteza a ela relacionada [24]. A ICH [126] reconhece várias formas de se obter o LOD. Uma das formas é a partir da relação entre o desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica e a inclinação da reta. Por este método,

$$LOD = 3,3 \frac{s}{b}$$

onde s = desvio padrão da resposta (no caso, o coeficiente linear da curva) e

b = coeficiente angular (inclinação) da curva.

Existem dois tipos de limite de detecção cada um com um objetivo estabelecido:

- limite de detecção do instrumento: em geral, o limite de detecção do instrumento serve como um guia para o estabelecimento do limite de detecção do método;

- limite de detecção do método: é a menor concentração do analito na amostra que, quando submetido a um processo analítico, produz um sinal definido como o limite de detecção do método. O cálculo do limite de detecção do método

leva em conta o fator de enriquecimento do método.

Limite de Quantificação (LOQ): o limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser medida com exatidão e precisão aceitáveis, nas condições experimentais. Normalmente é expresso em unidades de concentração. A relação sinal/ruído nesse caso foi definida como 10:1 e o erro associado à medida é de 30% com 99% de probabilidade [24]. As formas de cálculo são semelhantes ao cálculo dos LOD, porém considerando essa relação 10:1 entre sinal e ruído. Também aplicam-se os mesmos conceitos de LOD do instrumento e do método.

Os limites de detecção e de quantificação podem ser afetados pelo tipo de detector utilizado. Por exemplo, tipos de lâmpadas UV diferentes podem ter intensidades diferentes, o que irá afetar os limites. Outro fator é a região espectral onde são feitas as leituras. No caso de análise multirresíduo com o detector trabalhando em comprimento de onda fixo, não é possível fazer as medições no comprimento de onda de absorção máxima de todos os analitos, sendo necessário utilizar um comprimento de onda comum, o que compromete a obtenção dos menores limites possíveis.

A principal observação que se deve fazer quando se estabelecem limites é que o limite de quantificação do método deve estar abaixo dos valores de MRL estabelecidos, permitindo que o método atinja a quantificação dos níveis de resíduos mínimos permitidos nas legislações. Para resíduo de pesticidas em frutas, os MRL geralmente estão estabelecidos acima de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.

O LOQ também será um dos parâmetros que define um dos pontos da curva analítica (o primeiro ponto deve ser de concentração próxima ao LOQ) e os níveis de fortificação da amostra, estabelecidos como $1 \times \text{LOQ}$, $2 \times \text{LOQ}$ e $10 \times \text{LOQ}$ [17].

Exatidão: representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços. É expressa como o percentual de resposta obtido através do ensaio de uma quantidade conhecida do

analito incorporada na matriz em estudo (fortificação) ou através da análise de amostras-padrão certificadas, submetidas ao método em estudo. Nos casos de fortificação, que são os mais comuns devido à dificuldade em se obterem amostras certificadas (que para certas aplicações nem existem), a medida de exatidão é chamada de **recuperação** do método e é expressa em termos de porcentagem de analito quantificado em relação à quantidade acrescentada na etapa de fortificação, em um determinado número de ensaios.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{conc. medida do analito}}{\text{conc. inicial do analito}} \times 100$$

O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa. A ICH estabelece que um mínimo de 9 determinações envolvendo um mínimo de 3 níveis de fortificação deve ser obedecido. Por exemplo, ensaios em triplicata para 3 níveis de fortificação [126].

Precisão: representa o grau de concordância ou grau de dispersão entre resultados de medidas independentes, em torno de um valor central, quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de teste. Normalmente é expressa como estimativa de desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) em um número estatisticamente significativo de amostras.

$$\text{RSD (\%)} = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{recuperação média}} \times 100$$

onde

$$\text{Desvio padrão} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{N-1}}$$

onde: x_i = valor medido

$\bar{X}$ = média das medidas

N = número de medidas

A precisão pode ser expressa em três diferentes modos:

- repetibilidade: corresponde aos resultados obtidos através de várias repetições

de um método, nas mesmas condições, em curto intervalo de tempo (precisão entre ensaios). Essa determinação deve ser feita a partir de um mínimo de nove determinações (ex: 3 níveis, 3 replicatas);

- precisão intermediária: expressa o efeito das variações dentro do laboratório ao longo de alguns dias, por exemplo;

- reprodutibilidade: refere-se aos resultados de colaboração interlaboratorial.

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos de pesticidas geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão mínima de 20%. Porém, dependendo da complexidade analítica, da amostra e do tipo de resíduos, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão mínima de 15% [17].

Com avanço dos mecanismos de vigilância fitossanitária e dos sistemas de qualidade total, novos parâmetros são incorporados à rotina de validação. As publicações mais recentes citam os conceitos de *robustez* (*robustness*), conformidade do sistema (*system suitability*) e validação do instrumento [125,126].

A **robustez** corresponde à capacidade de um método de não ser afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros, como composição da fase móvel, pH, temperatura etc.

Os testes de **conformidade do sistema** são utilizados geralmente para verificar se a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico são adequadas para a análise a ser realizada.

A validação do instrumento engloba várias etapas e serve para certificar que o equipamento (inclusive seus componentes eletrônicos e software) está calibrado e em conformidade com parâmetros definidos pelo fabricante.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem aspectos de continuidade e de inovação.

Ele dá continuidade à linha de pesquisa de desenvolvimento de metodologias para análise de pesticidas em diferentes matrizes, cujos trabalhos anteriores [24,121,122,151-155] utilizaram água e urina como matrizes. Este trabalho visa ampliar esta linha de pesquisa, incorporando uva e tomate como novas matrizes e novos pesticidas, utilizados na fruticultura.

Inova propondo uma nova tecnologia para produção de materiais para SPE.

Sendo assim, os objetivos deste trabalho podem ser sintetizados nos seguintes tópicos:

- Desenvolvimento e validação de metodologias rápidas e eficientes para a determinação multirresíduo de diferentes classes de pesticidas em uva e tomate por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Foram estudados seis pesticidas de diferentes características físico-químicas e classes: atrazina, simazina e ametrina (herbicidas triazínicos), diuron e tebutiuron (herbicidas uréicos) e benomil (fungicida benzimidazólico).

- Utilização da técnica de extração em fase sólida (SPE) para *clean-up* da amostra e pré-concentração dos analitos, utilizando materiais tipo aminopropil (NH₂) e octadecil (C18), comerciais e produzidos no próprio laboratório, através de um procedimento inovador, mais simples, usando solventes menos tóxicos e de menor custo.

3. *EXPERIMENTAL*

Materiais

Reagentes e Solventes

- Acetona, grau P.A., Merck
- Acetonitrila, grau HPLC, Mallinckrodt e Merck
- Água ultrapura, Sistema Milli-Q, Millipore
- Diclorometano, grau HPLC, Mallinckrodt e Merck
- Éter de petróleo, grau HPLC, Mallinckrodt
- Hexano, grau HPLC, Mallinckrodt
- Hidróxido de amônio, grau P.A., Merck
- Metanol, grau HPLC, Mallinckrodt e Merck
- n-Pentano, grau HPLC, Mallinckrodt
- Sílica Gel, Acros; tamanho de partículas: 35-70 μ m; tamanho de poros: 6 nm
- Poli(dimetilsiloxano) com terminações aminopropil, PS-512, United Chemical Technologies (USA)
especificações técnicas: [156]
 - viscosidade (centistokes a 25 °C): 755
 - gravidade específica (a 25 °C): 0,98
 - índice de refração (a 25 °C): 1,403
- Poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS), PS-130, United Chemical Technologies (USA)
especificações técnicas: [156]
 - viscosidade (centistokes a 50 °C): 250-300
 - gravidade específica (a 25 °C): 0,89
 - índice de refração (a 25 °C): 1,443

Padrões de pesticidas

Os padrões de pesticidas foram conseguidos todos com pureza acima de 95%, por doação de instituições e empresas:

- benomil e diuron: doação da Embrapa Meio Ambiente - Jaguariúna;
- triazinas (atrazina, simazina e ametrina): doação da Novartis;

O padrão de tebutiuron foi adquirido da Supelco.

Colunas cromatográficas

- Colunas de fases reversa Purospher RP-18, Merck, partículas de 5 μm , dimensões: 125 x 3 mm
- Colunas de guarda Purospher RP-18, Merck, partículas de 5 μm , dimensões: 4x4 mm

Materiais para SPE

- cartuchos para Extração em Fase Sólida
 - aminopropil: Supelco LC-NH₂ e Merck LiChrolut NH₂
 - octadecil: Supelco LC-18 e Merck LiChrolut RP-18
- seringas tipo hipodérmica de polipropileno (6 mL), Ibrasmagamma
- filtros de polietileno, tamanho de poros: 20 μm , Supelco

Equipamentos

- Cromatógrafo a líquido, composto por:
 - bomba Waters, modelo 510
 - injetor SSI 3XL, com amostrador de 10 μL , modelo 02-0290
 - detector Waters, UV-Vis de comprimento de onda variável entre 190 e 700 nm, cela do detector de 14 μL de volume, modelo 481
 - software para aquisição e processamento de dados: ChromPerfect, Justice Innovations, versão 3.5
- Cromatógrafo a líquido, composto por:

- bomba Waters, modelo 515
 - injetor Rheodyne, modelo 7725i
 - detector Waters, UV-Vis com arranjo de diodos, modelo PDA 996
 - software para aquisição e processamento de dados: Millennium, Waters, versão 3.0
-
- Espectrofotômetro UV-Vis com arranjo de diodos. Hewlett Packard, modelo 8452A
 - Sistema de Extração em Fase Sólida Supelco Visiprep SPE Vacuum Manifold, modelo 12-port
 - Bomba de enchimento Haskel Inc., com faixa de pressão de 6,9 a 344,8 MPa (1000 a 50000 psi), modelo 51769
 - Banho ultrassônico Thornton, modelo T14
 - Centrífuga, Fisher Scientific
 - Agitador tipo vortex, Phoenix, modelo AP56
 - Balança analítica Fisher Scientific, modelo A-250
 - Sistema purificador de água Millipore, modelo Milli-Q Plus
 - pHmetro Digimed, modelo DM21
 - Estufa Yamato, modelo ADP-21
 - Liquidificador doméstico, Walita

Estratégia Experimental

A estratégia experimental adotada pode ser dividida em 2 grandes etapas: **a)** desenvolvimento de novos materiais para extração em fase sólida (que chamaremos daqui por diante de "fases sólidas"), envolvendo sua preparação e caracterização e **b)** desenvolvimento das metodologias de análise de pesticidas em uva e tomate, desde o estudo espectrofotométrico das espécies, passando pela otimização dos parâmetros de preparação das amostras, das condições cromatográficas, utilização das fases sólidas desenvolvidas, comparação com as fases sólidas comerciais similares, até a validação das metodologias propostas.

Foi realizada ainda a análise de uvas e tomates comercializados no varejo utilizando as metodologias desenvolvidas, nas condições onde se obtiveram os melhores resultados.

Desenvolvimento das Fases Sólidas

Preparação das fases sólidas

Pesa-se uma massa pré-estabelecida de polímero polissiloxano, que é dissolvido em n-pentano. Para fases sólidas tipo aminopropil (NH_2) foi utilizado o poli(dimetilsiloxano) com terminações aminopropil e para fases tipo octadecil (C_{18}), o poli(metiloctadecilsiloxano) - PMODS. Adiciona-se sílica gel previamente seca em estufa a 150°C durante 24h, à mistura polímero/pentano a fim de que a proporção seja de 12 mL de solvente para cada grama de polímero+sílica e que a massa de polímero seja 40% ou 10% da massa polímero+sílica (carga). Cargas de 40% (13 g de polímero, 20 g de sílica e 400 mL de pentano) foram utilizados na preparação das fases aminopropil e octadecil. Cargas de 10% (4 g de polímero, 37 g de sílica e 480 mL de pentano) foram empregados apenas para as fases aminopropil. A mistura sílica/polímero/pentano fica sob agitação magnética durante 3h. Após este tempo, a mistura é deixada em repouso, para evaporação do solvente, à temperatura ambiente. Para assegurar a evaporação completa do pentano, a fase sólida é levada à estufa a 40°C durante 60 min.

A etapa de imobilização térmica consiste em levar a fase sólida, isenta de solvente, para a estufa a 120°C , durante 4h, a pressão atmosférica. A fase sólida é depositada em uma placa de Petri, permitindo assim uma alta exposição de sua área superficial.

Em seguida é realizada uma extração do polímero em excesso. A extração consiste em introduzir a fase sólida dentro de um tubo de aço inox, com filtros em ambas as extremidades, e fazer passar através do tubo um solvente que irá arrastar o polímero em excesso. O solvente é bombeado por meio de uma bomba cromatográfica convencional (Waters, modelo 510). A sequência de eluição é a seguinte: **1)** hexano, na proporção de 25 mL de hexano por grama de fase sólida, a vazão de 2 mL min^{-1} ; **2)** metanol, na proporção de 15 mL de metanol por grama de fase sólida, a vazão de 3 mL min^{-1} . Na sequência é realizado um bombeamento de metanol a alta pressão (1000 psi ou 6,9 MPa), através de uma bomba de enchimento de colunas cromatográficas (Haskel), na proporção de 20 mL de metanol por grama de fase sólida e a secagem da fase a temperatura ambiente.

Caracterização

Os polímeros, a sílica e as fases sólidas preparadas e comerciais foram caracterizados através de análise elementar de carbono e nitrogênio (CHN), espectroscopia no infravermelho (IV), análise de área superficial específica e análise termogravimétrica (TGA). Para realização destas análises foram utilizados os serviços das salas de instrumento do Instituto de Química da Unicamp.

Análise elementar de carbono e nitrogênio (CHN)

A análise elementar de carbono e nitrogênio teve como objetivo avaliar o teor destes elementos na sílica e nos sorventes, antes e após a extração do excesso de polímero. O método empregado utiliza a combustão para converter o carbono e nitrogênio em seus óxidos (CO_2 e NO_2), que são então medidos em função de sua condutividade térmica. O aparelho utilizado foi um analisador elementar Perkin Elmer, modelo 2400.

Espectroscopia no infravermelho (IV)

A espectroscopia no infravermelho foi aplicada à sílica e às fases sólidas com o objetivo de avaliar qualitativamente o grau de recobrimento da superfície da sílica pelos polímeros, após a etapa de extração, comparando com as fases sólidas comerciais, através da presença de bandas características destes materiais.

Os espectros foram obtidos no intervalo espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , em um espectrofotômetro de infravermelho Perkin Elmer, modelo FT-IR 1600. O espectro dos polímeros foi obtido a partir de um filme em cela de cloreto de sódio, enquanto que para as fases sólidas os espectros foram obtidos pela prensagem da amostra, sob a forma de pastilhas, com brometo de potássio.

Análise termogravimétrica (TGA)

Amostras das fases sólidas produzidas e comerciais foram encaminhadas para análise termogravimétrica com o objetivo de avaliar sua estabilidade térmica. Os termogramas foram obtidos em um analisador térmico (analisador termogravimétrico TA Instruments, modelo TGA-2050) onde, através de uma microbalança, se obtém a porcentagem de perda de massa da amostra em função do aumento da temperatura. A análise foi realizada sob atmosfera inerte (argônio), com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, no intervalo de 25 a $900\text{ }^{\circ}\text{C}$. As análises das fases sólidas

produzidas no laboratório foram feitas em materiais após a etapa de extração do excesso de polímero.

Análise de área superficial específica

A área superficial específica expressa uma medida de área em relação à massa do material ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$). Foi utilizado o método de BET (Brunauer, Emmett e Teller), que se baseia na determinação do volume de nitrogênio adsorvido a diferentes pressões, na temperatura do nitrogênio líquido. O aparelho utilizado foi um medidor de área superficial Micromeritics, Flowsorb II, modelo 2300.

Confecção dos cartuchos

Os cartuchos de extração foram confeccionados utilizando seringas (Ibrasgamma) tipo hipodérmica de 6 mL, com corpo de polipropileno e preenchida com 500 mg de fase sólida (enchimento à seco), que fica retida por meio de dois filtros de polietileno com tamanho de poros de 20 μm . Estes cartuchos serão tratados daqui por diante como *lab-made*.

Os cartuchos comerciais empregados foram da marca Supelco (LC-NH₂ e LC-18) e Merck (LiChrolut NH₂ e LiChrolut RP-18). Os cartuchos Supelco foram empregados na fase inicial do trabalho e os Merck na fase final. A maioria dos ensaios de caracterização das fases sólidas foi realizada com cartuchos Merck. Na etapa de validação das metodologias não se observaram diferenças nos parâmetros medidos em função da mudança de fabricante dos dispositivos comerciais.

Desenvolvimento das Metodologias de Análise

Estudo espectrofotométrico dos pesticidas

Foram preparadas soluções-estoque de 100 mg L^{-1} em metanol dos pesticidas estudados. Por diluição das solução-estoque, em metanol:água (60:40, v/v), obtiveram-se soluções de trabalho em concentrações que variaram de 250 a 1800 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Em um espectrofotômetro com arranjo de diodos foram medidas as absorvâncias das soluções, obtendo-se assim o espectro de absorção no UV-Visível para cada pesticida em várias concentrações. O sinal foi monitorado entre 180 e 820

nm, mas para fins práticos trabalhou-se apenas entre 180 e 320 nm, região onde aparecem as bandas características dos pesticidas.

Com os dados obtidos foram traçadas curvas analíticas de absorvância vs. concentração, no comprimento de onda de máxima absorvância de cada pesticida e também em um comprimento de onda no qual todas espécies apresentaram absorvância. A partir dessas curvas analíticas, foram calculados os valores de absorvidade molar (ϵ), através do coeficiente angular das curvas e definido um comprimento de onda único para a análise cromatográfica, uma vez que o detector disponível (Waters, modelo 481) permitia a detecção em um único comprimento de onda durante uma dada corrida cromatográfica.

Soluções-padrão e calibração

As soluções de trabalho (padrões múltiplos de pesticidas em concentrações variando entre 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 50 mg L^{-1}) para obtenção das curvas analíticas e para fortificação das amostras de uva e tomate foram preparadas por diluição na fase móvel (acetonitrila:água (35:65, v/v)), a partir de soluções-estoque (padrões isolados) de 100 mg L^{-1} , em metanol. As soluções-estoque foram preparadas a cada 6 meses e as soluções de trabalho a cada 2 meses, segundo recomendação do GARP (Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas) [17].

As curvas analíticas foram obtidas injetando-se, em triplicata, 6 soluções de trabalho de concentração variando de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 5 mg L^{-1} .

Calibração na matriz

Com o propósito de verificar o efeito da matriz nos resultados, foram feitos experimentos de calibração na matriz. Os padrões de calibração na matriz, em concentrações variando de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 5 mg L^{-1} , são preparados através da mistura de soluções de trabalho, preparadas em acetonitrila:água (35:65, v/v), com o extrato do branco da amostra. Foi adotada a proporção de 0,5 mL do extrato da matriz para 1,5 mL de solução de trabalho [72]. Foram testados padrões de calibração em matrizes de uva e de tomate, cada uma delas submetidos aos métodos envolvendo cartuchos aminopropil e octadecil.

Fortificação das amostras

O procedimento de fortificação consistiu em adicionar, de forma homogênea, à 5 g de amostra-testemunha, isto é, isenta de pesticidas, 100 μL de solução de trabalho contendo uma mistura dos pesticidas nas concentrações de 5, 10 e 50 mg L^{-1} , de maneira a resultar nos níveis de concentração desejados: 100, 200 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, que daqui por diante chamaremos F1, F2 e F3.

Amostragem e estocagem das amostras

As amostras-testemunha de uva (*Vitis sp.*) niágara rosada, foram amostradas em uma pequena plantação caseira, na cidade de Piumhi-MG, onde se pôde ter absoluto controle quanto à ausência de pesticidas. As amostras de tomate (*Lycopersicon lycopersicum*) foram obtidas no comércio varejista da cidade de Campinas-SP, porém tomou-se o cuidado de se adquirir tomates do tipo "orgânico", comercializados como ausentes de agrotóxicos. A análise em branco das amostras-testemunha comprovou a ausência de picos relacionados aos pesticidas em estudo, na região espectral de trabalho (235 nm).

Após a amostragem, foram separadas as partes comestíveis das uvas e tomates, que foram cortadas e homogeneizadas em liquidificador doméstico. As amostras homogeneizadas foram transferidas para potes de vidros, em porções de 30 g, que foram selados sob atmosfera de nitrogênio e congelados em freezer. As amostras, homogeneizadas e trituradas foram estocadas por um período máximo de 12 meses [17].

Condições cromatográficas

Após vários estudos de composição de fases móvel e de vazão, estabeleceu-se a fase móvel acetonitrila:solução aquosa de NH_4OH 0,01% (pH 8,4) (35:65, v/v), em modo isocrático de eluição, à vazão de 0,7 mL min^{-1} , como condições otimizadas para as corridas cromatográficas dos padrões de calibração e dos extratos de amostras. Foram utilizadas colunas Purospher RP-18 (Merck, partículas de 5 μm), com coluna de guarda acoplada.

Para os experimentos de validação de metodologia utilizou-se o detector espectrofotométrico de absorção no UV-Visível, de comprimento de onda variável, com detecção fixa em 235 nm.

Para as análises das amostras de uva e tomate obtidas no varejo, aplicando-se as metodologias desenvolvidas, utilizou-se o cromatógrafo com detector de arranjo de diodos, na faixa de 190 a 320 nm. Pôde-se ainda realizar a confirmação da identidade dos picos dos pesticidas em estudo, injetando-se soluções padrões e amostras fortificadas, comparando-se o espectro de absorção no UV dos pesticidas na amostra e nas soluções-padrão.

Procedimento de preparo das amostras

Foram testados e otimizados dois procedimentos de preparo de amostra, um empregando cartuchos de SPE tipo aminopropil (NH_2) e o outro com cartuchos octadecil (C18). Em ambos os procedimentos foram seguidas as seguintes etapas: pesagem da amostra; fortificação; extração dos analitos da matriz; partição líquido-líquido; centrifugação e separação da fase orgânica; extração em fase sólida e análise cromatográfica.

A tabela 9 mostra os cartuchos que foram testados em cada tipo de amostra; todos os cartuchos continham 500 mg de fase sólida.

Tabela 9: Amostras e cartuchos utilizados no desenvolvimento das metodologias

Amostra	Cartuchos testados
Uva	- aminopropil comercial * - aminopropil <i>lab-made</i> (carga 10%) - aminopropil <i>lab-made</i> (carga 40%) - octadecil comercial ** - octadecil <i>lab-made</i> (carga 40%)
Tomate	- aminopropil comercial * - aminopropil <i>lab-made</i> (carga 40%) - octadecil comercial ** - octadecil <i>lab-made</i> (carga 40%)

* Supelco LC- NH_2 e Merck LiChrolut NH_2

** Supelco LC-18 e Merck LiChrolut RP-18

Procedimento para cartuchos aminopropil (NH_2)

Em um tubo de centrífuga de 50 mL foram pesados 5 g de amostra (uva ou tomate, devidamente homogeneizados), que foram fortificados com soluções de pesticidas em quantidades conforme o nível de fortificação desejado ou não foram fortificados, no caso das análises em branco. Adicionaram-se 100 μL de solução aquosa de NH_4OH 1%. Foram adicionados 7 mL de acetona e a mistura foi agitada em

um agitador tipo vortex durante 30 segundos. Em seguida, adicionaram-se 7 mL de diclorometano e 7 mL de éter de petróleo, agitando-se novamente por mais 30 segundos em vortex. A mistura foi centrifugada por 15 minutos a 8000 rpm e separou-se a fase orgânica, que foi concentrada até a secura sob fluxo de nitrogênio. O resíduo sólido foi dissolvido em 1 mL de diclorometano e procedeu-se a extração em fase sólida. Os cartuchos do tipo aminopropil, posicionados em um sistema multi-vias (Manifold), foram condicionados com 2 mL de diclorometano. As amostras, dissolvidas em diclorometano, foram aplicadas aos cartuchos e eluídas com uma mistura diclorometano:metanol (99:1, v/v), em duas porções de 3 mL cada e a uma vazão de 3 mL min⁻¹. A solução eluente foi concentrada até a secura sob fluxo de nitrogênio e redissolvida em 2 mL de metanol, obtendo-se assim soluções enriquecidas 2,5 vezes em relação à fortificação inicial, que foram levadas à análise cromatográfica.

Procedimento para cartuchos octadecil (C18)

Em um tubo de centrífuga de 50 mL foram pesados 5 g de amostra (uva ou tomate, devidamente homogeneizados), que foram fortificados com soluções de pesticidas em quantidades conforme o nível de fortificação desejado ou não foram fortificados, no caso das análises em branco. Adicionaram-se 100 µL de NH₄OH 1%. Foram adicionados 20 mL de acetona:água (1:1, v/v) e a mistura foi colocada em banho ultrassônico durante 15 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 8000 rpm e separou-se a fase líquida, a qual se adicionaram 20 mL de água e procedeu-se a extração em fase sólida. Os cartuchos do tipo octadecil, posicionados em sistema Manifold, foram condicionados com 5 mL de metanol e 5 mL de água. As amostras foram percoladas através dos cartuchos, a uma vazão de 3 mL min⁻¹. Em seguida, trocou-se o solvente para diclorometano (10 mL) e procedeu-se a eluição dos componentes retidos, também a vazão de 3 mL min⁻¹. A solução eluente foi concentrada até a secura sob fluxo de nitrogênio e redissolvida em 2 mL de metanol, obtendo-se assim soluções enriquecidas 2,5 vezes em relação à fortificação inicial, que foram levadas à análise cromatográfica.

Validação das metodologias

As metodologias foram validadas seguindo diretrizes da ICH [125,126], GARP [17] e ANVISA [127,128]. Os parâmetros avaliados foram seletividade, curva analítica

(linearidade, coeficiente de correlação, coeficiente angular, coeficiente linear), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), recuperação (R) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária). As medidas de recuperação e de repetibilidade foram feitas com bases em 6 replicatas de cada ensaio e as medidas de precisão intermediária, com bases em 3 replicatas, realizadas em 3 dias consecutivos.

Análise de uvas e tomates do varejo

Com o propósito de investigar a presença de algum dos pesticidas estudados em frutas comercializadas no varejo, foram feitas análises de uvas e tomates empregando as metodologias desenvolvidas usando cartuchos aminopropil comercial e *lab-made* 40% de carga, que foram os que apresentaram melhores resultados na validação.

Foram selecionadas amostras das mesmas espécies utilizadas no desenvolvimento das metodologias. A identificação dos picos presentes foi feita via detecção por arranjo de diodos, qualitativamente, através da análise do perfil espectrofotométrico de absorção no UV para cada pico e da comparação do tempo de retenção do analito com o do padrão correspondente.

O procedimento experimental foi o desenvolvido para cartuchos aminopropil (item "Procedimento para cartuchos aminopropil (NH₂)" deste capítulo, pag. 47). Foram também realizados ensaios de recuperação nestas amostras, no nível de fortificação F1.

4. APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS

Desenvolvimento das fases sólidas

Preparação e caracterização

O método adotado na preparação das fases sólidas é uma adaptação do procedimento de preparação de fases estacionárias para HPLC, desenvolvido em nosso grupo de pesquisas [104-122]. O procedimento para fases estacionárias utiliza partículas de sílica de 5 ou 10 μm , enquanto nas fases sólidas as partículas têm tamanho variando de 35 a 70 μm .

A estratégia adotada na preparação destes materiais consiste na sorção, sobre a superfície da sílica, de um polímero cujo esqueleto é do tipo alquilsiloxano (figura 6a), com cadeias laterais que configuram sua funcionalidade. Estudos anteriores [105,106,108,115,116,118,119], comprovaram que esta sorção pode não ser mecanicamente estável, sendo necessária a imobilização do polímero. Dentre os vários métodos de imobilização pesquisados, o de imobilização térmica foi o mais eficiente, promovendo o entrecruzamento (*cross-linking*) das cadeias poliméricas e eventualmente induzindo a formação de ligações estáveis entre polímero e sílica [157].

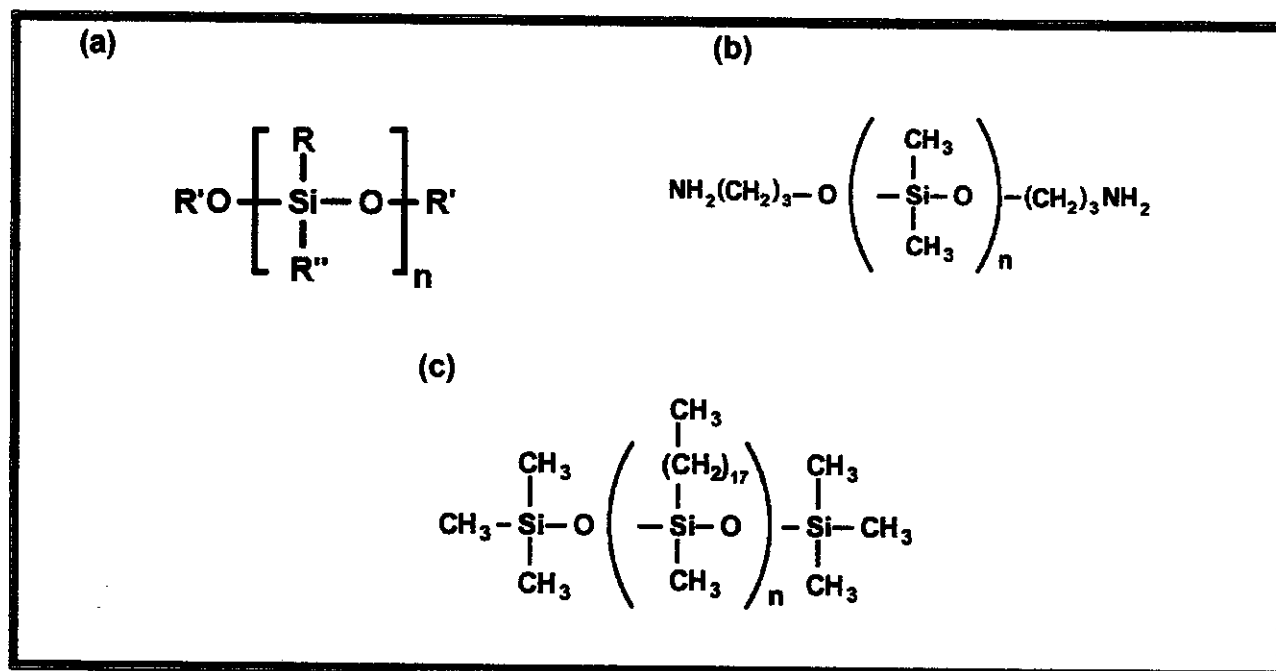


Figura 6: (a) Polialquilsiloxano (estrutura geral), (b) poli(dimetilsiloxano) com terminações aminopropil e (c) poli(metiloctadecilsiloxano)

Durante a sorção do polímero sobre a sílica, utiliza-se um excesso de polímero, a fim de assegurar um amplo recobrimento das partículas de sílica, assim como o preenchimento dos poros. Após a etapa de imobilização, qualquer que seja o método empregado, faz-se necessário a remoção da massa de polímero excedente, através das etapas de extração.

Os polímeros empregados (poli(dimetilsiloxano) com terminações aminopropil, que chamamos "aminopropil" ou "NH₂" – figura 6b – e poli(metiloctadecilsiloxano, que chamamos "PMODS", "octadecil" ou "C18" – figura 6c) são ambos polissiloxanos. O PMODS possui forte característica apolar (útil na extração de compostos apolares), devido às terminações metil e octadecil ligadas ao silício e que se repetem na unidade monomérica fundamental. O polímero aminopropil, no entanto, possui grupos (CH₂)₃NH₂ em suas terminações; estes grupos possuem propriedades polares (úteis na extração de compostos polares) e de trocador aniônico fraco, dependendo do meio onde atua.

A tabela 10 mostra algumas características dos materiais preparados e dos comerciais similares.

Tabela 10: Características das fases sólidas desenvolvidas, comerciais e sílica

Material	Tipo de ligação	% C	% N	Capeamento	Tamanho de poro (nm)	Tamanho de partícula (µm)
Sílica	-	0,37	0,20	-	6	35-70
Fase sólida NH ₂ comercial	$\equiv\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ (silano monofuncionalizado)	4,1 (5)*	2,0	sim	6	45
Fase sólida C18 comercial	$\equiv\text{Si}(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ (silano monofuncionalizado)	18 (17)*	0,20	sim	6	45
Fase sólida NH ₂ lab made 40% antes da extração	Poli(dimetilsiloxano) aminofuncionalizado imobilizado sobre sílica	13,1	0,79	não	6	35-70
Fase sólida NH ₂ lab made 40% após a extração	Poli(dimetilsiloxano) aminofuncionalizado imobilizado sobre sílica	12	0,51	não	6	35-70
Fase sólida NH ₂ lab made 10% antes da extração	Poli(dimetilsiloxano) aminofuncionalizado imobilizado sobre sílica	3,8	0,28	não	6	35-70
Fase sólida NH ₂ lab made 10% após a extração	Poli(dimetilsiloxano) aminofuncionalizado imobilizado sobre sílica	3,5	0,26	não	6	35-70
Fase sólida C18 lab made antes da extração	Poli(dimetiloctadecilsiloxano) imobilizado sobre sílica	22	0,17	não	6	35-70
Fase sólida C18 lab made após a extração	Poli(dimetiloctadecilsiloxano) imobilizado sobre sílica	15	0,15	não	6	35-70

* valores fornecidos pelo fabricante (Supelco)

Análise elementar de carbono e nitrogênio (CHN)

Os dados de % carbono e de nitrogênio foram obtidos experimentalmente e os demais a partir de informações dos fabricantes. Pode-se observar, pelos valores dos materiais comerciais, que os dados experimentais concordam com os dados de catálogo.

Os teores de carbono para as fases sólidas aminopropil 10% após extração (3,5%) são mais próximos ao do material similar comercial (4,1%), enquanto nas fases aminopropil 40%, há uma maior incorporação de carbono à superfície da sílica (12%). Em termos de porcentagem de carbono, as fases sólidas octadecil preparadas (15%) são muito semelhantes às comerciais (18%). Nota-se uma diminuição da quantidade de carbono nas fases após as extrações, em comparação com antes das extrações, demonstrando que essa etapa do processo realmente elimina o polímero excedente. Para as fases aminopropil, a queda na quantidade de carbono devido à extração é da ordem de 6%, enquanto na fase octadecil é da ordem de 30%, indicando que o polímero aminopropil tem maior interação com o suporte do que o PMODS.

Já com relação às quantidades de nitrogênio, as fases sólidas aminopropil comerciais têm teores maiores (2,0%) que as fases aminopropil preparadas (0,51 e 0,26%). Isso porque, como as fases *lab-made* são obtidas a partir de polímero com grupos aminopropil apenas nas extremidades das cadeias, a quantidade de nitrogênio é proporcionalmente menor do que nas fases comerciais, obtidas via reação química com moléculas orgânicas pequenas. A quantidade de nitrogênio nas fases aminopropil 40% é maior que nas fases aminopropil 10% (0,51 e 0,26% N, respectivamente), resultado este que está associado, e comprova, maior incorporação de polímero sobre a sílica no caso de carga inicial de 40%.

Espectroscopia no infravermelho (IV)

As figuras 7 a 9 mostram os espectros no infravermelho para a sílica e polímeros (figura 7), fases sólidas comerciais e *lab-made* aminopropil (figura 8) e octadecil (figura 9).

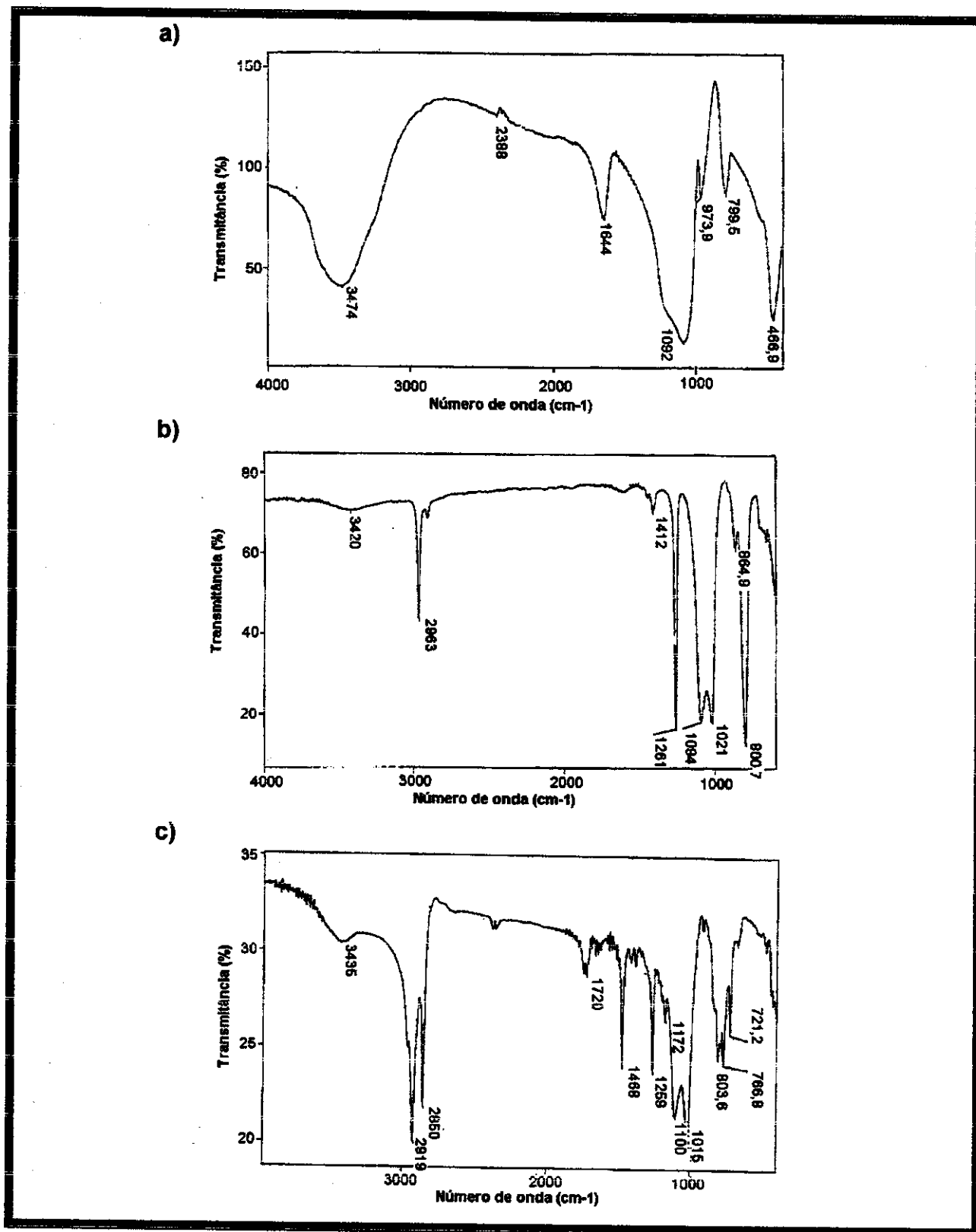


Figura 7: Espectros IV da (a) sílica e dos polímeros (b) poli(dimetilsiloxano) aminofuncionalizado e (c) poli(metiloctadecilsiloxano)

O espectro da sílica (figura 7a) tem bandas características nas regiões de 3475 cm^{-1} (banda larga devido aos grupos silanóis), 1640 cm^{-1} (ligações siloxano), 1090 cm^{-1} (silanóis) e 970 cm^{-1} (silanóis livres). O espectro do polímero aminopropil (figura 7b) tem bandas características nas regiões de 2965 cm^{-1} (devido aos grupos metila), 1260 cm^{-1} (ligação C-N), duplete em 1090 e 1020 cm^{-1} (grupos siloxano) e em 800 cm^{-1} (metilas). O espectro do PMODS (figura 7c) tem bandas características nas regiões de 2900 cm^{-1} (triplete relativo aos grupos metila), 1100 e 1015 cm^{-1} (duplete relativo aos grupos siloxano) e em 800 cm^{-1} (metilas).

Os espectros das fases sólidas mostram bandas características da sílica e dos polímeros, evidenciando uma incorporação destes à superfície do suporte. A figura 8 mostra os espectros IV das fases sólidas aminopropil, com as bandas referentes à sílica, na região de 3450 e 1090 cm^{-1} e os sinais de grupos metila em 2900 e 800 cm^{-1} . Observa-se que nas fases sólidas *lab-made* pré-extração (figuras 8b e 8d) a banda em 2900 cm^{-1} é nitidamente mais intensa que nos materiais extraídos (figura 8c e 8e), indicando arraste de polímero em excesso. Outro indicativo do recobrimento da superfície da sílica é o sinal em 970 cm^{-1} , relativo a silanóis livres, que aparece no espectro da sílica (figura 7a), aparece com pequena intensidade no material comercial (figura 8a) (pois a reação se dá nesses sítios) nos materiais *lab-made* com 40% de polímero (figura 8b e 8c) (devido a alta carga de polímero encobrindo os grupos silanóis livres) e aparece também com intensidade um pouco maior nas fases *lab-made* com 10% de polímero (figura 8d e 8e devido à baixa carga de polímero, deixando os grupos silanóis parcialmente expostos).

A figura 9 mostra os espectros IV das fases sólidas octadecil, com as bandas referentes à sílica, em 3450 e 1090 cm^{-1} . Nas fases comerciais, o espectro (figura 9a) diferencia-se da sílica apenas pela intensa diminuição do sinal em 970 cm^{-1} (silanóis livres) e por um discreto aparecimento de bandas na região de 2900 cm^{-1} , relativas aos grupos metila. Nas fases *lab-made* (figura 9b e 9c) essas bandas são mais evidentes, pois a fonte de metilas é o polímero, que possui uma quantidade maior destes grupos. O sinal em 970 cm^{-1} também surge muito tênue, indicando um bom recobrimento de grupos silanóis livres.

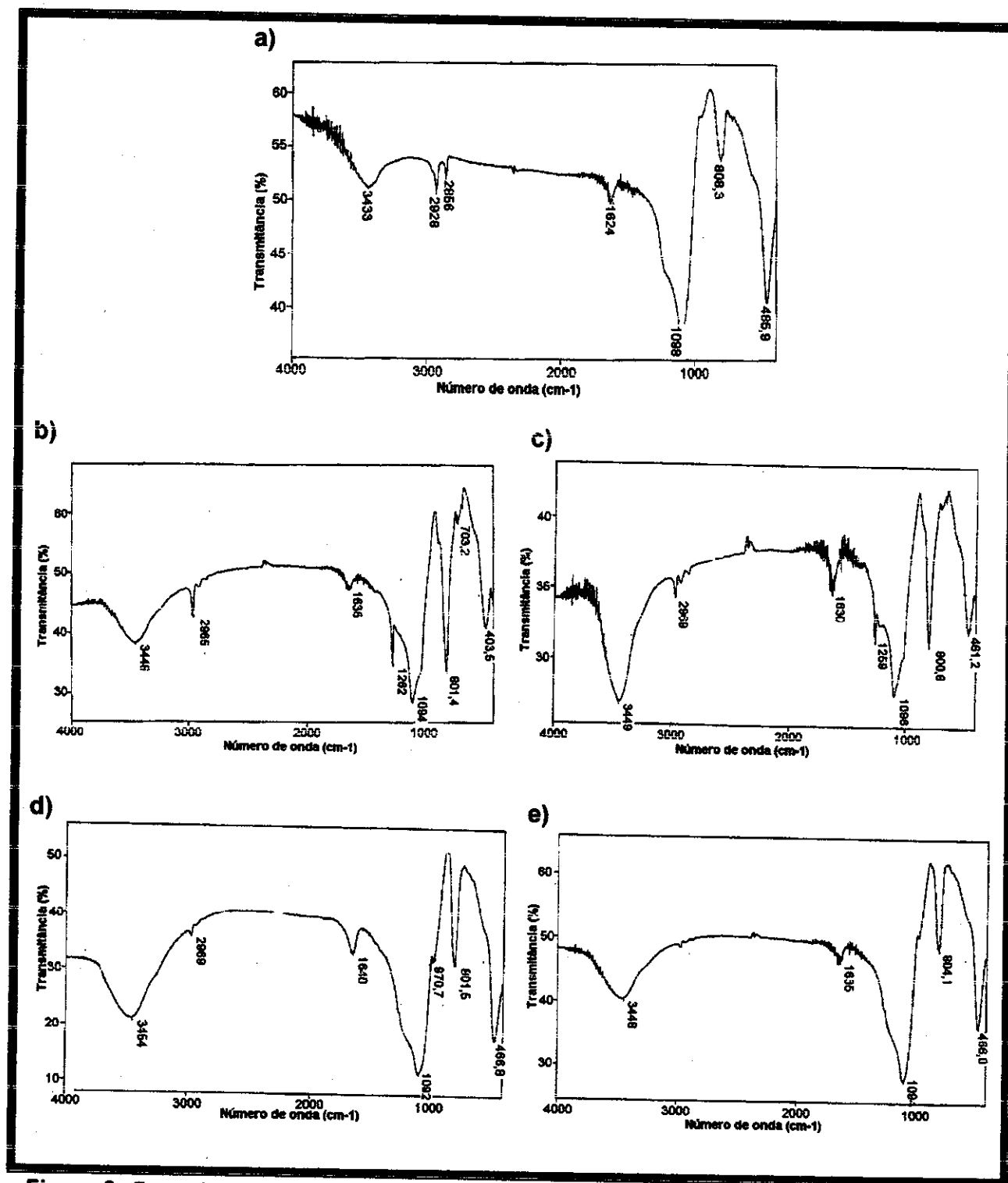


Figura 8: Espectros IV de fases sólidas aminopropil. **a)** comercial; **b)** *lab-made* 40% pré-extração; **c)** *lab-made* 40% pós-extração; **d)** *lab-made* 10% pré-extração; **e)** *lab-made* 10% pós-extração

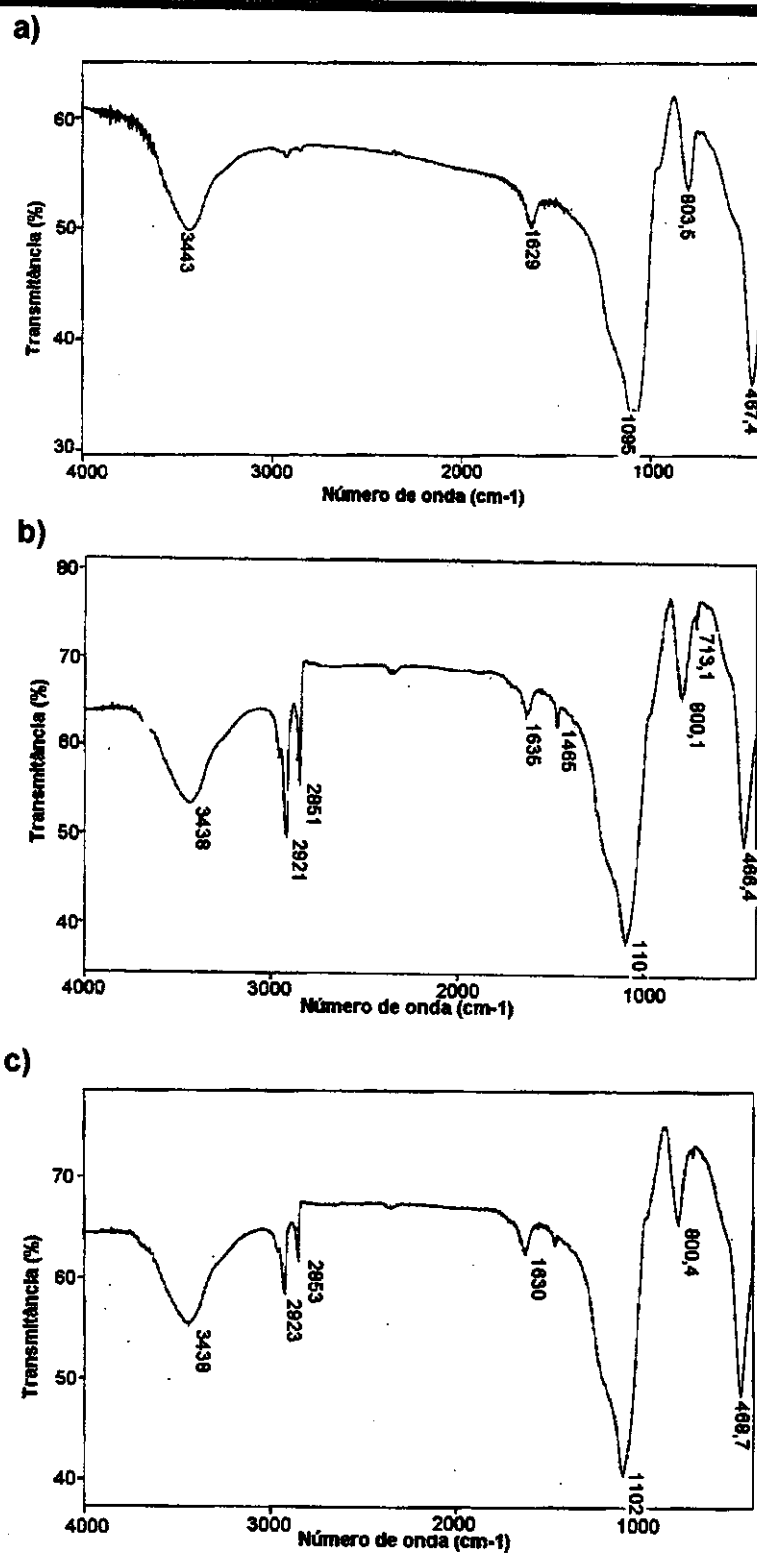


Figura 9: Espectros IV das fases sólidas octadecil. a) comercial; b) lab-made 40% pré-extração; c) lab-made 40% pós-extração

Análise termogravimétrica (TGA)

A figura 10 mostra os termogramas das fases sólidas comerciais e *lab-made* aminopropil e octadecil. A tabela 11 mostra a perda de massa ocorrida durante a análise de TGA no intervalo total da corrida termogravimétrica (25 a 1000 °C) e também no intervalo de 25 a 200 °C, que é o intervalo de temperatura que inclui a faixa onde são realizadas a maioria das análises cromatográficas (25 a 80 °C).

O perfil termogravimétrico indica, para as fases aminopropil, duas regiões importantes onde há perda de massa: uma entre 40 e 80 °C e a outra entre 400 e 600 °C. A primeira pode estar associada à perda de água presente na amostra e a segunda já propriamente devido à decomposição térmica do polímero (no caso das fases *lab-made*) ou da própria estrutura do sorvente (no caso da fase comercial). Com relação aos valores de perda de massa (tabela 11), observa-se que a fase aminopropil *lab-made* 40% tem a maior perda de massa (24,7%) quando considerado todo o intervalo da corrida termogravimétrica, enquanto a fase aminopropil *lab-made* 10% é a mais estável, com 6,41% de perda de massa. Porém, considerando o intervalo de temperatura onde se praticam a maioria dos experimentos cromatográficos e de preparação de amostra, nota-se que as fases sólidas *lab-made* têm maior estabilidade térmica do que a fase comercial, com perda de massa de 0,24 e 1,60% (*lab-made* 40 e 10%, respectivamente), ao passo que o sorvente comercial tem perda de massa de 2,21% nesse intervalo.

Já para as fases octadecil, as perdas de massa mais significativas acontecem entre 250 e 350 °C e entre 400 e 550 °C, perdas estas atribuídas à decomposição dos grupos C18 e da estrutura polimérica, no caso das fases *lab-made*. Os resultados mostram que o material desenvolvido tem propriedades de estabilidade térmica semelhantes ao similar comercial, com perda de 19,9% na faixa de 25 a 1000 °C (contra 22,3% do comercial) e de 0,60% na faixa de 25 a 200 °C (contra 0,65%).

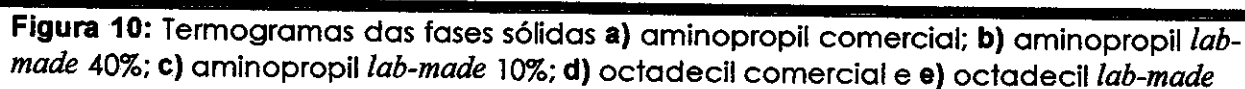


Tabela 11: Resultados das análises termogravimétricas para fases sólidas comerciais e *lab-made*

Fase sólida	Perda de massa (%) de 25 a 1000 °C	Perda de massa (%) de 25 a 200 °C
NH ₂ comercial	11,8	2,21
NH ₂ <i>lab-made</i> 40%	24,7	0,24
NH ₂ <i>lab-made</i> 10%	6,41	1,60
C18 comercial	22,3	0,65
C18 <i>lab-made</i>	19,9	0,60

Análise de área superficial específica

A tabela 12 mostra uma redução no valor de área superficial específica nas fases sólida *lab-made*, em comparação com a sílica. Essa redução se deve ao bloqueio parcial dos poros da sílica pelos polímeros utilizados. A redução na área é menor para os materiais aminopropil, pois o polímero aminofuncionalizado tem grupos funcionais de menor volume espacial do que o PMODS, com seus grupos octadecil.

Para as fases comerciais, o mesmo efeito se observa, porém os resultados numéricos não podem ser comparados, pois são sílicas com tamanho de partículas diferentes.

Em SPE, deseja-se que os materiais tenham alta área superficial específica, o que irá contribuir para maior capacidade de adsorção dos analitos. Logo, os materiais aminopropil *lab-made* são os mais adequados dentre os sorventes estudados, sob o aspecto de área superficial específica.

Tabela 12: Resultados de análise de área superficial específica

Fase sólida	S _{BET} (m ² g ⁻¹)
Sílica	606,69
NH ₂ <i>lab-made</i> 40%	329,67
NH ₂ <i>lab-made</i> 10%	379,01
C18 <i>lab-made</i>	190,08
NH ₂ comercial	254,32
C18 comercial	94,72

Desenvolvimento das Metodologias de Análise

A seleção das amostras e dos pesticidas foi feita segundo alguns parâmetros. As opções de amostras foram sugeridas pela Dr^a Vera Ferracini, da Embrapa Meio Ambiente. Tanto uvas como tomates são produzidos e consumidos em grande quantidade no país, sendo que a produção de uvas tem um forte direcionamento para exportações, principalmente nas áreas de fruticultura irrigada do Vale do São Francisco, que têm o apoio do Governo Federal e parceria com a Embrapa.

Os pesticidas foram selecionados de forma a se obter um conjunto multiclasse e com características físico-químicas diferentes. O benomil e o tebutiuron foram selecionados por serem pesticidas bastante empregados na viticultura. As triazinas e o diuron foram escolhidos pela disponibilidade de padrões em nosso laboratório e por serem substâncias já incorporadas à linha de pesquisa sobre análise de resíduos de pesticidas de nosso grupo [24,152,153], além de serem amplamente empregadas em lavouras de tomate. Alguns pesticidas em estudo, como a atrazina e simazina, são proibidos em alguns países, portanto, é necessário o desenvolvimento de metodologias mesmo para os pesticidas proibidos, para sua análise no caso de uso ilegal.

Estudo espectrofotométrico dos pesticidas

O objetivo do estudo espectrofotométrico foi obter os espectros das espécies pesquisadas e definir um comprimento de onda comum onde todos os compostos apresentassem absorção da radiação ultravioleta, já que o equipamento disponível para o desenvolvimento do trabalho possui um detector que permite análises apenas em comprimento de onda fixo.

A figura 11 mostra os espectros de absorvância no ultravioleta, na faixa de 180 a 320 nm, para os pesticidas benomil, tebutiuron, simazina, atrazina, diuron e ametrina, em concentrações que variaram de 250 a 1800 µg L⁻¹. Observa-se uma similaridade entre os espectros dos pesticidas de uma mesma classe (como, por exemplo, as triazinas), porém eles diferem-se de uma classe para outra.

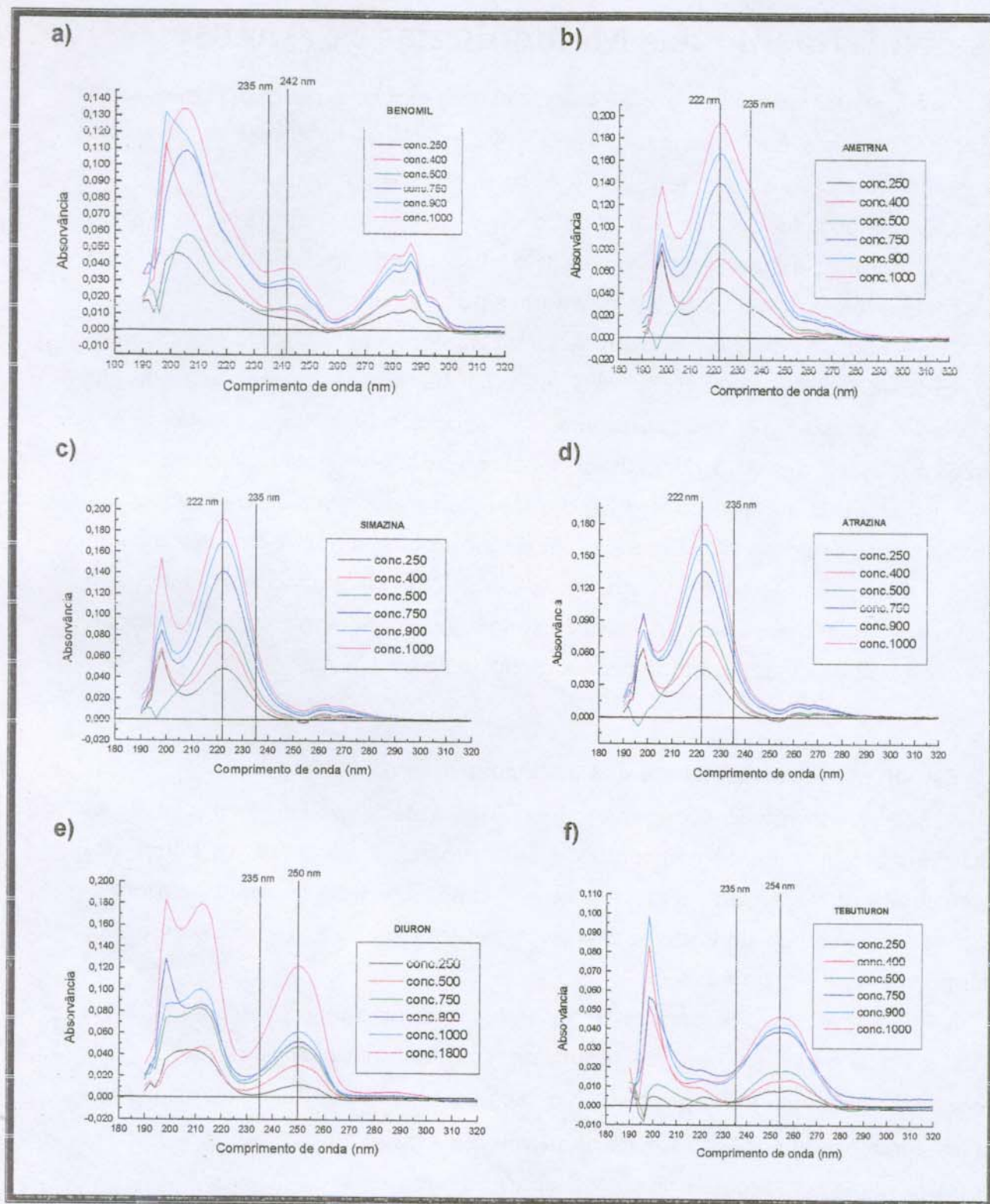


Figura 11: Espectros de absorção no ultravioleta (180-320 nm) dos pesticidas estudados ((a) benomil, (b) ametrina, (c) simazina, (d) atrazina, (e) diuron, (f) tebutiuron), em concentrações variando de 250 a 1800 $\mu\text{g L}^{-1}$

Os valores de comprimento de onda onde há máxima absorvância são distintos entre as várias classes de pesticidas e isso torna difícil o estabelecimento de um comprimento de onda único para detecção de todas as espécies. Isto fica evidente na tabela 13, onde são listados os valores de comprimento de onda onde há o máximo de absorvância ($\lambda_{\max}$) e os valores de absortividade molar (ϵ) calculados neste comprimento de onda e em um comprimento de onda (235 nm) onde há absorção de todas as espécies. Os comprimentos de onda de máxima absorvância e o comprimento de onda com absorvância comum a todas as espécies estão destacados nos espectros da figura 11.

Tabela 13: Valores de $\lambda_{\max}$ e de absortividade molar (ϵ) dos pesticidas estudados

Pesticida	$\lambda_{\max}$ (nm)	ϵ ($\lambda_{\max}$) (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (235 nm) (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)
Benomil	242	12224	7218
Tebutiuron	254	12202	6904
Simazina	222	38938	18436
Atrazina	222	39604	19795
Diuron	250	16680	6968
Ametrina	222	44841	33443

Os valores de ϵ foram calculados a partir de curvas analíticas para cada pesticida. A partir desses dados, estabeleceu-se o comprimento de onda de 235 nm para a detecção simultânea dos analitos. Para a maioria dos casos, perde-se a detecção no máximo de absorvância, o que irá implicar em limites de detecção mais altos, porém o fato de se realizar a análise multirresíduo compensa esse efeito.

Identidade dos picos cromatográficos

A figura 12a mostra um cromatograma de uma solução-padrão contendo todos os pesticidas estudados, obtido em um cromatógrafo com detecção por arranjo de diodos. Esta ferramenta permite a identificação dos compostos, pela obtenção dos espectros de absorção no UV de cada um dos picos, no intervalo de comprimento de onda selecionado, e posterior comparação com os espectros do composto puro. A figura 12b mostra um cromatograma obtido no comprimento de onda de 235 nm

A tabela 14 mostra os espectros de absorção no UV de cada um dos picos da figura 12a, no intervalo de 190 a 320 nm e os espectros de cada um dos pesticidas puros, obtidos em um espectrofotômetro UV-Vis com arranjo de diodos. A comparação

entre os dois espectros de cada pesticida atesta a identidade dos compostos analisados, permitindo conhecer a ordem de eluição cromatográfica.

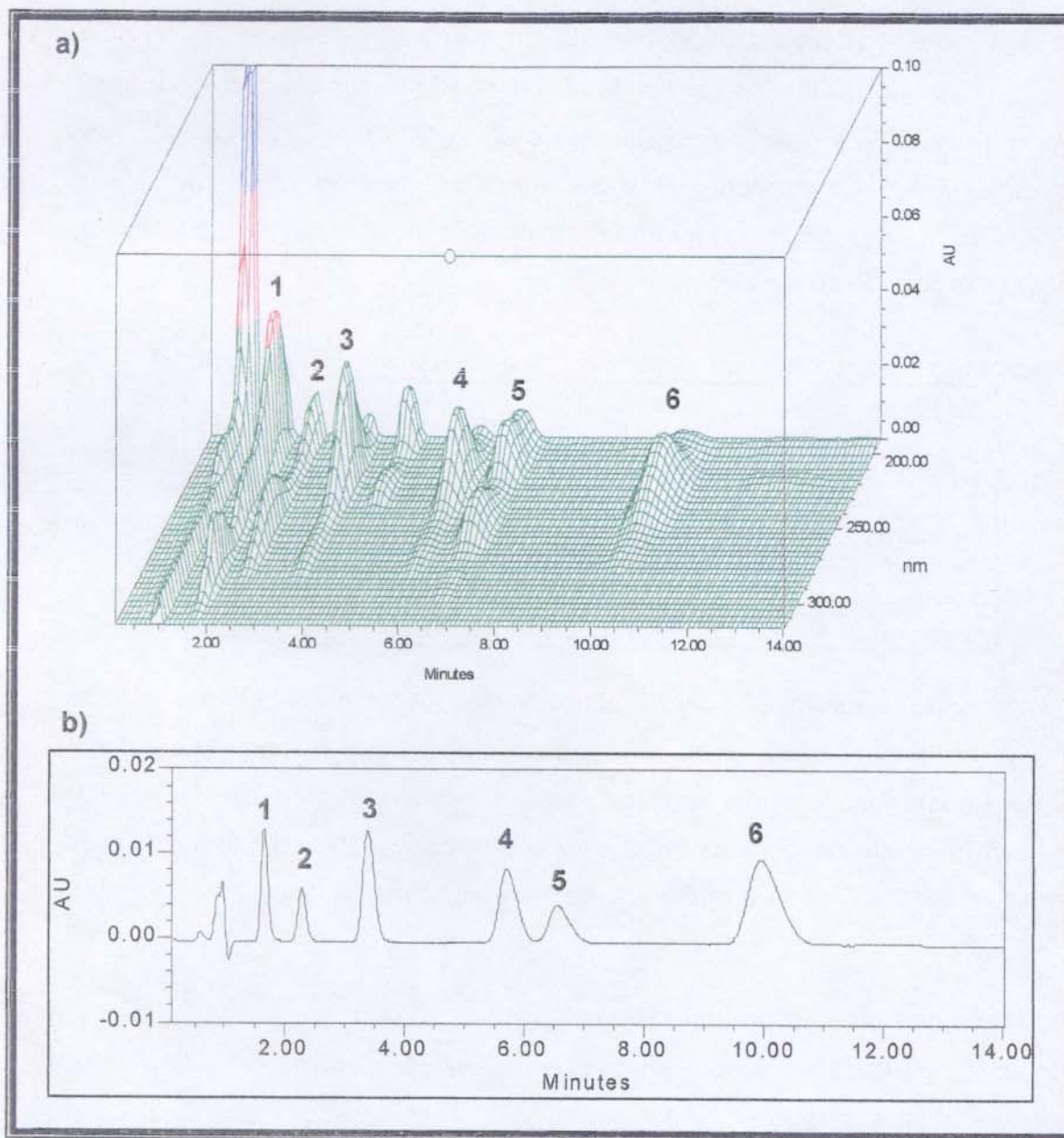
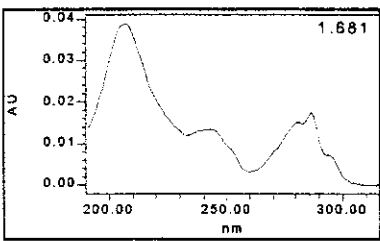
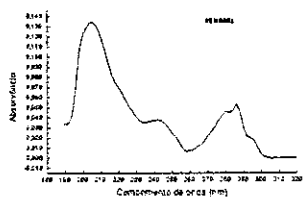
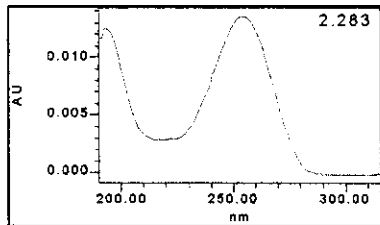
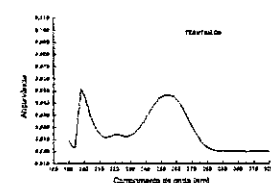
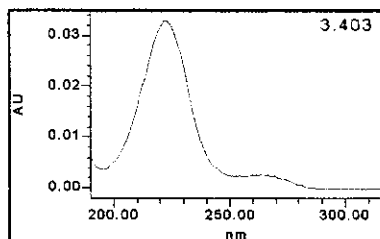
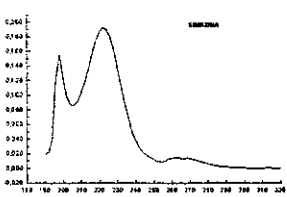
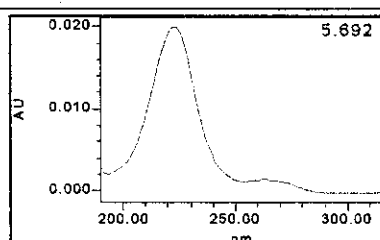
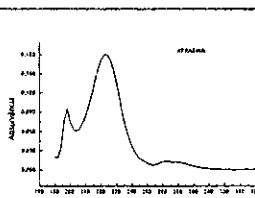
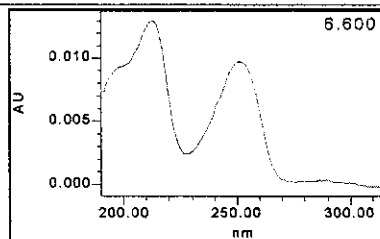
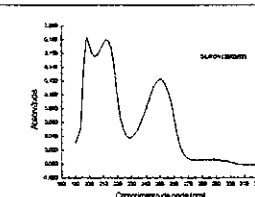
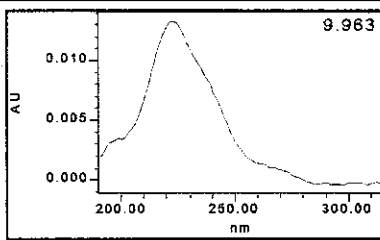
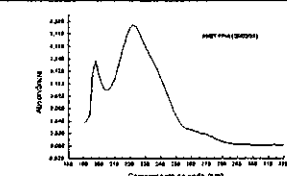


Figura 12: Cromatogramas dos padrões de pesticidas. **a)** detecção por arranjo de diodos (190-320 nm); **b)** detecção em 235 nm. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; coluna Purospher RP-18 125 x 3 mm; fase móvel CH_3CN :solução aquosa de NH_4OH 0,01% (pH 8,4) (35:65, v/v); vazão: 0,7 mL min^{-1} . Pesticidas (concentração de 2 mg L^{-1}): (1) benomil, (2) tebutiuron, (3) simazina, (4) atrazina, (5) diuron, (6) ametrina

Tabela 14: Espectros dos padrões de pesticidas, (a) extraídos do cromatograma tridimensional e (b) obtidos a partir de solução do padrão puro

Pesticida	Espectro extraído do cromatograma 3D	Espectro do padrão puro
Benomil		
Tebutiuron		
Simazina		
Atrazina		
Diuron		
Ametrina		

Procedimento de preparo das amostras

O *Pesticide Analytical Manual* (PAM), elaborado pelo FDA [94], estabelece uma separação nas estratégias de análise de pesticidas em alimentos segundo a quantidade de gordura (lipídios). Em alimentos com teor de lipídios abaixo de 2%, a etapa inicial de extração é feita com acetona, acetonitrila ou acetato de etila; para alimentos com teor de lipídios acima de 2%, utilizam-se solventes de menor polaridade. Na sequência são realizadas as etapas de *clean-up*, de acordo com as características dos resíduos e das matrizes analisados.

A grande maioria das frutas se enquadra no primeiro caso: uvas possuem em torno de 0,58% de lipídios e tomates 0,33% [158]. Além dos lipídios, as frutas possuem uma grande quantidade de componentes; os principais, para uvas e tomates, são: água (acima de 80%), proteínas, carboidratos, fibras, minerais (Na, Fe, Mg, P, K, Ca, Zn, Cu, Mn, Se), vitaminas (principalmente vitamina C), aminoácidos, carotenóides, antocianinas e flavonóides. Esta pequena amostra dá uma idéia da complexidade que consiste em estabelecer um método que isole os pesticidas, em um nível de concentração detectável, de todos os componentes que possam dar resposta simultaneamente.

Dois procedimentos de preparo de amostra foram estabelecidos, adaptando-se procedimentos previamente descritos na literatura. O procedimento utilizando os cartuchos aminopropil foi adaptado da metodologia de de Kok e Hiemstra [64], reduzindo-se as quantidades de amostra e solventes utilizados. Este procedimento, publicado pela AOAC International (*Association of Official Analytical Chemists*), foi inicialmente proposto para análise de carbamatos por HPLC e de várias outras classes de pesticidas por GC e hoje é referência no monitoramento de pesticidas em frutos realizado por países da Comunidade Européia [132-134]. O procedimento para cartuchos octadecil foi inicialmente proposto por Torres *et al.* [71] para análise multirresíduo de inseticidas piretróides e fungicidas nitrogenados heterocíclicos por cromatografia gasosa.

Ambos os procedimentos iniciam pelas etapas de pesagem da amostra, fortificação e extração dos analitos da matriz com acetona (ou mistura acetona:água, para octadecil).

Na etapa de fortificação, realizada nos ensaios onde se calculou a recuperação dos métodos, foram feitos testes em 3 níveis de fortificação, que correspondiam a 1 x LOQ, 2 x LOQ e 10 x LOQ do método.

Na preparação da amostra para a extração em fase sólida com cartuchos aminopropil foi feita uma etapa de partição líquido-líquido com diclorometano e éter de petróleo, a fim de isolar os analitos na fase orgânica, que é concentrada e redissolvida. O modo de SPE que se emprega aqui é o de *clean-up*, onde uma quantidade mínima de amostra é introduzida na fase sólida e eluída com um solvente apolar (diclorometano:metanol, 99:1 (v/v)). O objetivo é que os interferentes (na maioria polares) fiquem retidos na fase sólida aminopropil, que é um material polar, fazendo passar os analitos, que são de menor polaridade. Ao final, o solvente é evaporado até a secura e o extrato ressuspenso em metanol.

A amostra preparada para os cartuchos octadecil é diluída em um volume maior de água e esse volume é passado pelo cartucho. Nesse caso, o modo de SPE é o de pré-concentração, onde os analitos ficam retidos na fase (apolar), deixando passar os interferentes polares, que têm pouca afinidade pelo material C18. Na sequência, troca-se o eluente por um solvente de menor polaridade (diclorometano), que retira os analitos retidos da fase sólida. Ao final, após evaporação do solvente até a secura e ressuspensão do extrato em metanol, acerta-se o volume da solução que será injetada no cromatógrafo, estabelecendo-se assim a concentração da solução final (em níveis detectáveis) e o fator de enriquecimento do método que, nas metodologias desenvolvidas, foi de 2,5 vezes.

As tabelas 15 e 16 esquematizam as quantidades calculadas para fortificação das amostras e as soluções finais nos níveis de concentração estabelecidos.

Tabela 15: Quantidades calculadas para fortificação inicial das amostras, tomando-se como massa inicial 5 g de uva ou tomate

Nível de fortificação	Concentração da solução inicial de pesticida (mg L ⁻¹)	Volume adicionado à matriz (μL)	Massa de matriz (g)	Massa de pesticida em 5 g de matriz (μg)	Concentração de pesticida em 5 g de matriz (μg kg ⁻¹)
F1	5	100	5	0,5	100
F2	10	100	5	1	200
F3	50	100	5	5	1000

Tabela 16: Quantidades envolvidas no cálculo das soluções finais, tomando-se como volume final 2 mL de solução

Nível de fortificação	Massa inicial pesticida adicionada (μg)	Volume final de solução (mL)	Concentração final ($\mu\text{g L}^{-1}$) *
F1	0,5	2	250
F2	1	2	500
F3	5	2	2500

* concentração teórica, supondo recuperação de 100%

A otimização das condições cromatográficas foi feita com amostras-padrão, sendo que a identificação dos picos foi feita por meio da comparação entre os tempos de retenção dos analitos na mistura e de injeções de cada um deles em solução individual. Utilizando-se o cromatógrafo com detecção por arranjo de diodos, na faixa de 190 a 320 nm, pôde-se realizar a confirmação da identidade dos picos dos pesticidas em estudo, em soluções padrões e em amostras fortificadas, usando para isso, além da comparação dos tempos de retenção, os espectros de absorção no UV.

Validação das Metodologias

Seletividade

A figura 13 mostra exemplos de cromatogramas de análise em branco (todos os componentes da amostra, exceto os analitos de interesse), onde se pode perceber a ausência de interferentes na região de eluição dos analitos.

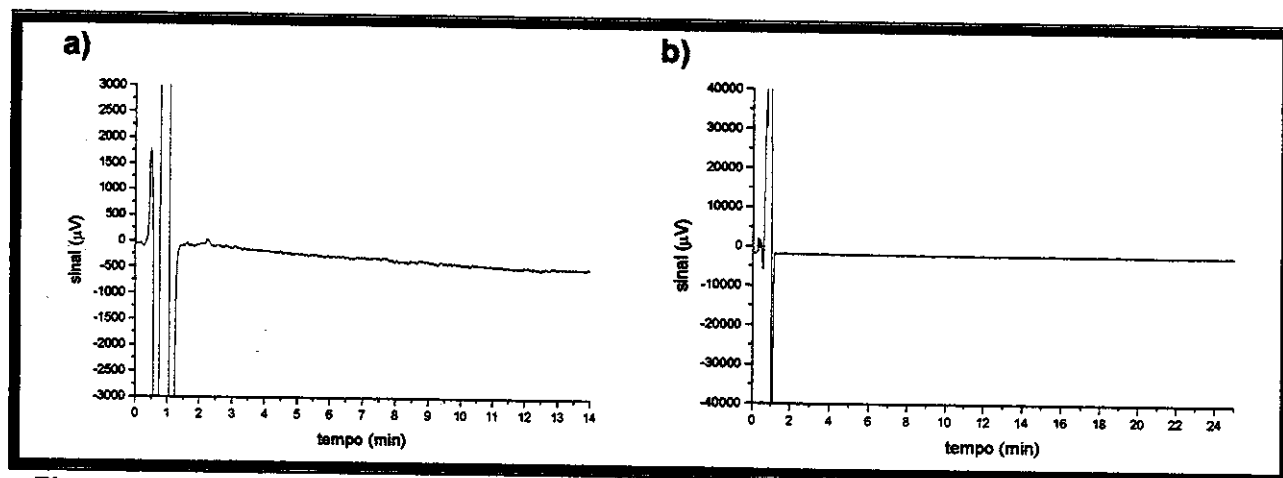


Figura 13: Cromatogramas de análises em branco de (a) uva e (b) tomate, com cartucho NH_2 comercial. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 μL ; coluna Purospher RP-18 125 x 3 mm, com coluna de guarda; fase móvel CH_3CN :solução aquosa de NH_4OH 0,01% (pH 8,4) (35:65, v/v); vazão: 0,7 mL min^{-1} ; detecção: 235 nm

As figuras 14 e 15 mostram exemplos de cromatogramas de extratos de uva e tomate fortificados, demonstrando a qualidade dos métodos com relação à seletividade.

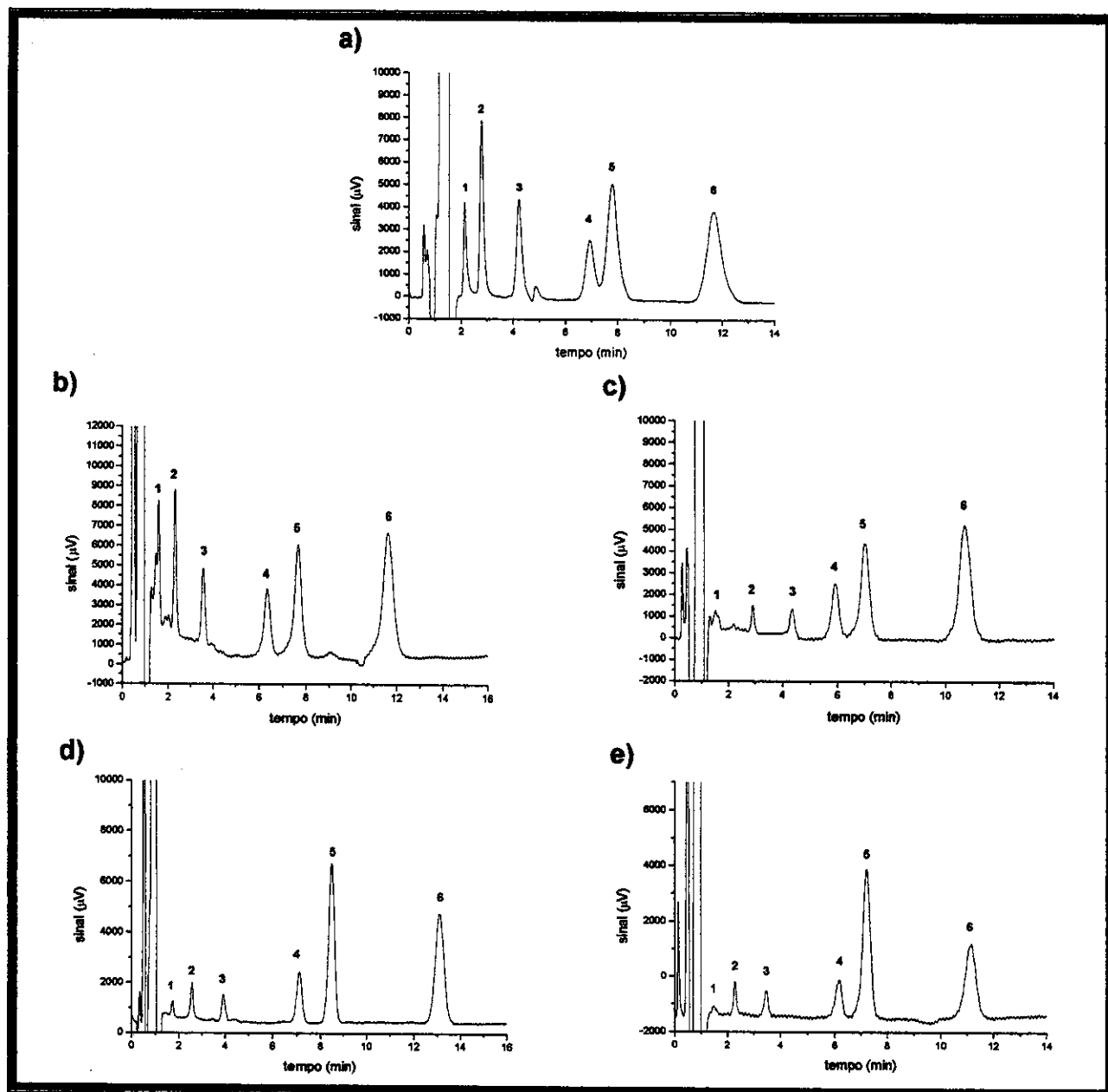


Figura 14: Cromatogramas de análises de uvas fortificadas: **(a)** F3, cartucho NH₂ comercial, **(b)** F3, cartucho NH₂ lab-made 40%, **(c)** F3, cartucho NH₂ lab-made 10%, **(d)** F3, cartucho C18 comercial, **(e)** F2, cartucho C18 lab-made. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 µL; coluna Purospher RP-18 125 x 3 mm, com coluna de guarda; fase móvel CH₃CN:solução aquosa de NH₄OH 0,01% (pH 8,4) (35:65, v/v); vazão: 0,7 mL min⁻¹; detecção: 235 nm. Pesticidas: **(1)** benomil, **(2)** tebutiuron, **(3)** simazina, **(4)** atrazina, **(5)** diuron, **(6)** ametrina

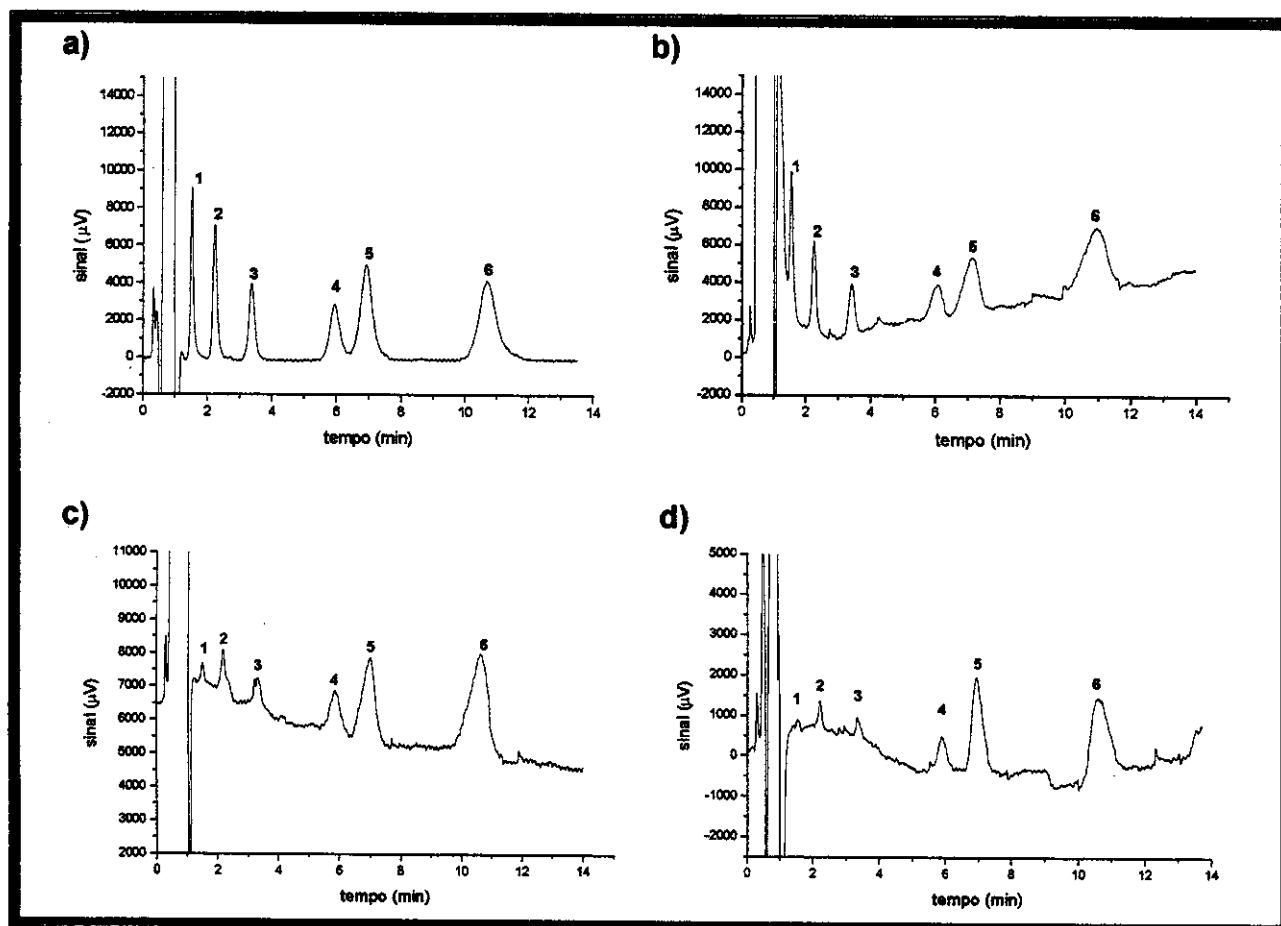


Figura 15: Cromatogramas de análises de tomates fortificados: **(a)** F3, cartucho NH_2 comercial, **(b)** F3, cartucho NH_2 *lab-made* 40%, **(c)** F3, cartucho C18 comercial, **(d)** F3, cartucho C18 *lab-made*. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 μL ; coluna Purospher RP-18 125 x 3 mm, com coluna de guarda; fase móvel CH_3CN :solução aquosa de NH_4OH 0,01% (pH 8,4) (35:65, v/v); vazão: 0,7 mL min^{-1} ; detecção: 235 nm. Pesticidas: **(1)** benomil, **(2)** tebutiuron, **(3)** simazina, **(4)** atrazina, **(5)** diuron, **(6)** ametrina

Para mostrar a importância da etapa de extração em fase sólida para a preparação das amostras, foram realizados experimentos onde se obtiveram cromatogramas de amostras fortificadas e preparadas através da rotina analítica desenvolvida, excluindo-se a etapa de SPE. Os cromatogramas são mostrados na figura 16 e as recuperações calculadas estão na tabela 17. O perfil cromatográfico mostra nitidamente a importância desta etapa para a remoção de interferentes da matriz e os baixos valores de recuperação indicam que a presença de componentes da matriz, que não foram devidamente extraídos, altera significativamente os resultados.

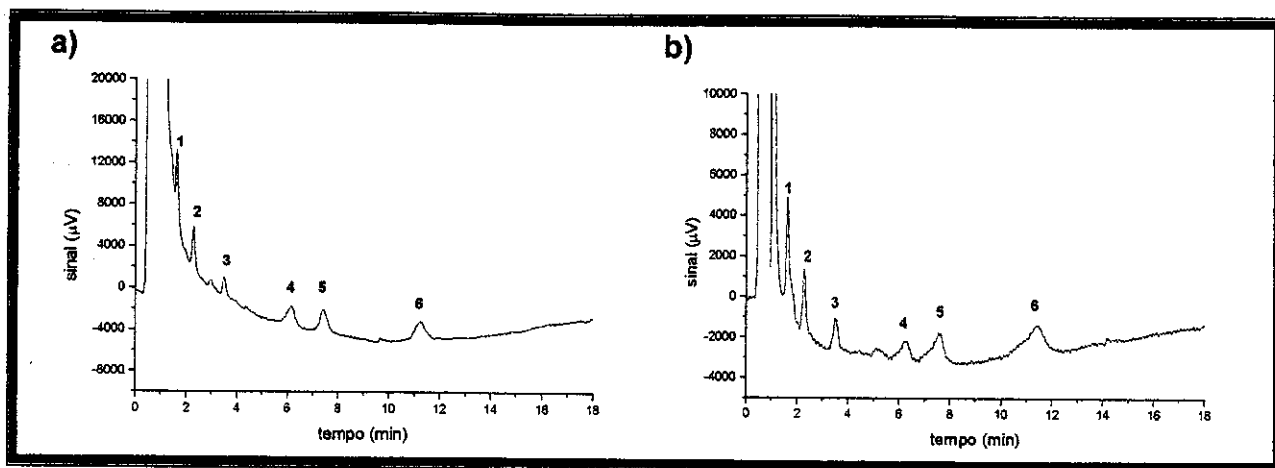


Figura 16: Cromatogramas de amostras de (a) uva e (b) tomate fortificados (F3) e tratados, sem a etapa de SPE. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 µL; coluna Purospher RP-18 125 x 3 mm, com coluna de guarda; fase móvel CH₃CN:solução aquosa de NH₄OH 0,01% (pH 8,4) (35:65, v/v); vazão: 0,7 mL min⁻¹; detecção: 235 nm. Pesticidas: (1) benomil, (2) tebutiuron, (3) simazina, (4) atrazina, (5) diuron, (6) ametrina

Tabela 17: Recuperações (%) para pesticidas em uva e tomate, em níveis de fortificação F3: 1000 µg kg⁻¹, empregando procedimentos sem a etapa de SPE

Pesticida	Recuperação (%)	
	Uva	Tomate
Benomil	32	60
Tebutiuron	33	36
Simazina	28	35
Atrazina	49	41
Diuron	31	34
Ametrina	24	36

Obs: Os parâmetros de calibração e os limites de detecção e de quantificação, apresentados a seguir, foram obtidos para soluções de padrões de pesticidas preparados em solvente acetonitrila:água (35:65, v/v). Os resultados de exatidão e precisão (tabelas 21 a 24 e figuras 18 a 26) foram calculados com base nessa calibração.

Os resultados de calibração e de LOD e LOQ para soluções preparadas com o extrato da matriz são mostrados no item "Estudo Sobre o Efeito da Matriz" – pag. 96).

Calibração

A calibração do método é feita a partir da curva analítica, cujos principais parâmetros são a linearidade e a sensibilidade. Os resultados para as curvas obtidas

indicam linearidade em valores que vão de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ até pelo menos 10 mg L^{-1} . A tabela 18 mostra parâmetros de uma das curvas analíticas obtidas (figura 17).

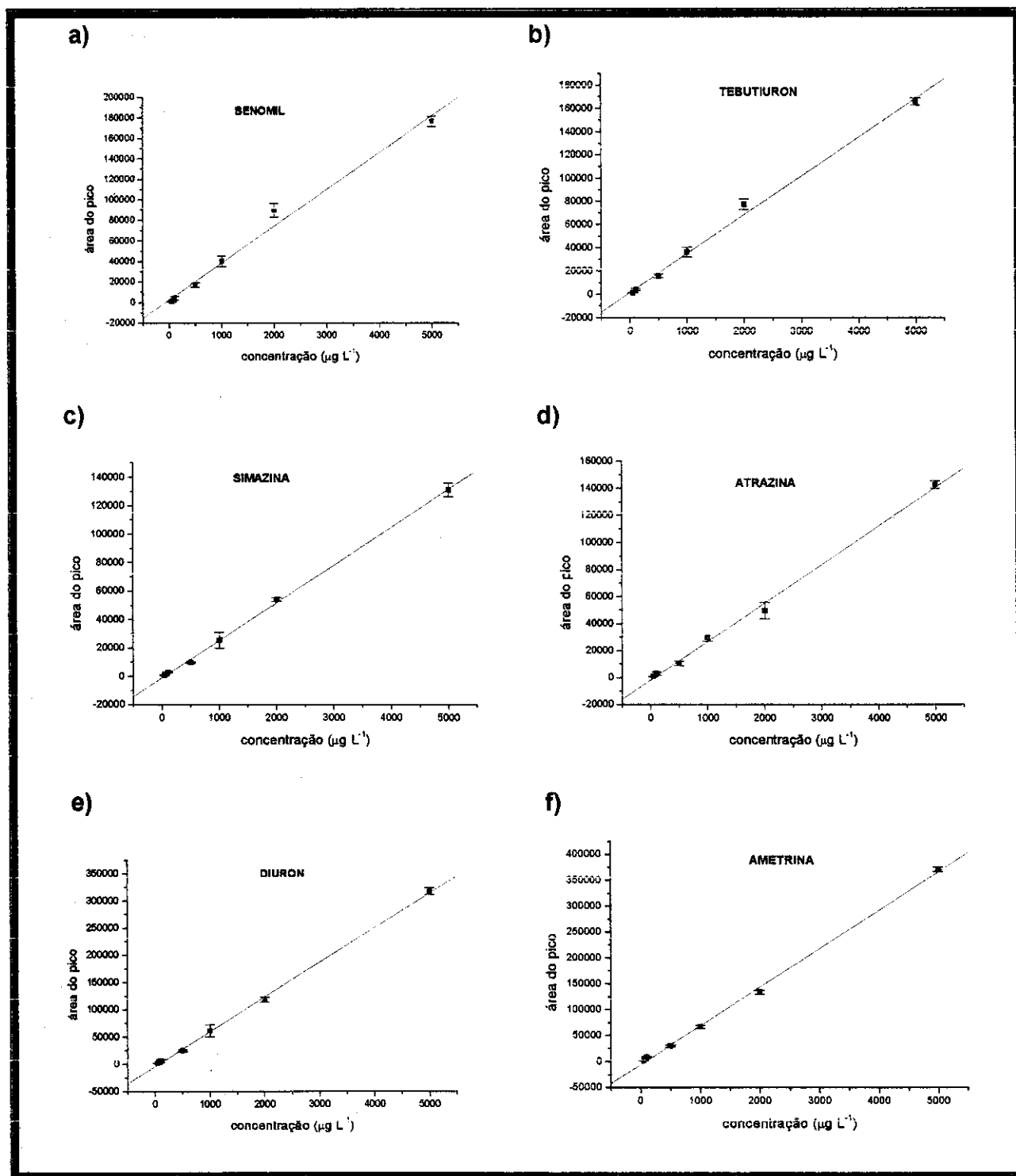


Figura 17: Curvas analíticas típicas, obtidas entre 50 a $5000 \mu\text{g L}^{-1}$ para (a) benomil, (b) tebutiuron, (c) simazina, (d) atrazina, (e) diuron, (f) ametrina em $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (35:65, v/v)

Tabela 18: Parâmetros das curvas analíticas

Pesticida	a (intercepto)	b (inclinação)	r	linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Benomil	3302,22	35,8106	0,99350	50 – 50000
Tebutiuron	2007,40	33,3612	0,99746	50 – 10000
Simazina	-828,742	26,4942	0,99955	50 – 50000
Atrazina	-1632,36	28,5347	0,99812	50 – 10000
Diuron	-2938,27	63,6808	0,99951	50 – 50000
Ametrina	-5083,03	74,3967	0,99900	50 – 10000

$y = a + bx$; a = coeficiente linear; b = coeficiente angular; r = coeficiente de correlação

O coeficiente angular (b) da curva representa a **sensibilidade** do detector. Quanto maior o ângulo de inclinação da reta, maior será a variação do sinal em relação a pequenas variações de concentração. Os valores da tabela 18 indicam que o sistema de detecção utilizado é mais sensível para diuron e ametrina.

Valores de coeficiente de correlação acima de 0,99 são exigidos em calibrações analíticas. Os resultados obtidos estão de acordo com esse requisito.

A verificação dos limites de linearidade foi realizada pelo método descrito por Augusto *et al.* [146] (vide item “Validação de Metodologias” no capítulo de Introdução – pag. 29) e indica que a faixa de concentração de trabalho (50 - 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$) está inserida dentro do intervalo de linearidade (50 - 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para tebutiuron, atrazina e ametrina e 50 - 50000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para benomil, simazina e diuron).

Limites de Detecção (LOD) e Limites de Quantificação (LOQ)

Os valores de limites de detecção (LOD) e de limites de quantificação (LOQ) foram calculados a partir das curvas analíticas, sendo:

$$LOD = 3,3 \frac{s}{b} \quad \text{e} \quad LOQ = 10 \frac{s}{b}$$

onde:

s = desvio padrão do coeficiente linear da curva e

b = coeficiente angular (inclinação) da curva

Esta forma de cálculo é reconhecida e recomendada pela ICH [126].

Após a obtenção da curva, é feito o cálculo, obtendo-se assim os LOD e LOQ do instrumento. Na sequência, são calculados os LOD e LOQ do método, considerando a capacidade de pré-concentração do método, que é de 2,5 vezes. Assim, os LOD e LOQ do método foram obtidos dividindo os LOD e LOQ do instrumento por 2,5 vezes.

Estes valores (tabela 19) são diretamente influenciados pelo tipo de detector e pelo comprimento de onda adotado. Neste trabalho, como a determinação é multirresíduo de classes diferentes e como a detecção é feita em comprimento de onda fixo, não se pôde trabalhar no máximo de absorvância. Com isso, os LOD e LOQ foram mais altos do que se fossem obtidos com detecção nos máximos de absorvância.

Tabela 19: Limites de detecção e quantificação (expressos em $\mu\text{g kg}^{-1}$)

Pesticida	Instrumento		Método	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Benomil	54	163	22	65
Tebutiuron	45	138	18	55
Simazina	37	113	15	45
Atrazina	36	108	14	43
Diuron	36	110	14	44
Ametrina	71	214	28	86

Dentre os limites calculados, o de maior importância é o LOQ do método. Em análise de resíduos, o primeiro ponto da curva analítica deve ser um valor próximo do LOQ do método [17, 126] e os níveis de fortificação, para ensaios onde se calcula a recuperação do método, devem ser de 1 x LOQ, 2 x LOQ e 10 x LOQ do método [17, 126].

Como os valores de LOQ do método variaram de 43 a 86 $\mu\text{g kg}^{-1}$, estabeleceu-se o valor de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ como base para as fortificações (os níveis de fortificação foram, portanto, 100, 200 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e o menor ponto da curva foi de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Outro ponto importante com relação ao LOQ do método é que ele esteja abaixo dos MRL, os limites máximos de resíduo, definidos pelas legislações de cada país, para cada matriz e para cada pesticida. A tabela 20 mostra os LOQ do método e os MRL estabelecidos por diferentes legislações. Como quase a totalidade dos MRL são iguais ou acima de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, foi definido este valor como parâmetro para os níveis

de fortificação.

Tabela 20: Limites de quantificação do método e valores de MRL de diferentes legislações (expressos em $\mu\text{g kg}^{-1}$)

Pesticida	LOQ método	MRL Brasil/Codex [159, 160]	MRL EUA [161]	MRL Europa [162]
Benomil	65	10000 (uva) 1000 (tomate)	10000 (uva) 5000 (tomate)	2000 (uva) 500 (tomate)
Tebutiuron	55	n.d.	n.d.	n.d.
Simazina	45	n.a.	250 (uva) n.d. (tomate)	n.a.
Atrazina	43	n.d.	n.d.	100 (uva) 100 (tomate)
Diuron	44	100 (uva) n.d. (tomate)	1000 (uva) n.d. (tomate)	n.d.
Ametrina	86	200 (uva) n.d. (tomate)	n.d.	n.d.
Outros pesticidas	-	>200 (uva) >500 (tomate)	>100 (uva) >200 (tomate)	>50 (uva) >50 (tomate)

n.d.: não definido (MRL não definido)

n.a.: não autorizado (uso do pesticida não autorizado)

Exatidão e Precisão

As tabelas 21 e 22 mostram os resultados de recuperação e precisão (repetibilidade e precisão intermediária) dos métodos desenvolvidos, empregando fases sólidas *lab-made* e comerciais similares para uva e tomate, respectivamente.

Os dados das tabelas 21 e 22 são dispostos a seguir na forma de gráficos (figuras 18 a 22 e 23 a 26, respectivamente), permitindo melhor visualização dos resultados.

Tomando sempre como critério de aceitabilidade valores de recuperação entre 50 e 120% e de precisão até 15% [17], nota-se que há, tanto para uva quanto para tomate, uma nítida diferenciação entre os métodos utilizando cartuchos aminopropil e octadecil. Em termos gerais, os cartuchos com material aminopropil geram melhores resultados do que com a metodologia onde se empregam sorventes C18, e dentre as análises com aminopropil, as fases sólidas *lab-made* com carga de 40% de polímero são as que apresentam melhor desempenho, superando em alguns casos os materiais comerciais.

Tabela 21: Recuperações (n=6) e precisões (repetibilidade, n=6, e precisão intermediária, n=3) para pesticidas em uva, em níveis de fortificação F1: 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, F2: 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e F3: 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, empregando cartuchos aminopropil comercial e *lab-made* (40 e 10% de carga de polímero) e octadecil comercial e *lab-made* (40% carga)

CARTUCHO NH2 COMERCIAL

	Recuperação (%)			Repetibilidade (%)			Precisão intermediária (%)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Benomil	49	26	28	13	27	49	8,9	79	25
Tebutiuron	87	78	72	12	10	10	4,9	50	12
Simazina	71	88	81	0,8	10	8,5	1,5	8,4	8,7
Atrazina	87	98	94	7,0	14	12	6,6	8,4	18
Diuron	105	93	81	3,7	10	11	15	9,1	12
Ametrina	84	88	93	11	9,3	11	18	3,9	4,3

CARTUCHO NH2 LAB-MADE 40%

	Recuperação (%)			Repetibilidade (%)			Precisão intermediária (%)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Benomil	143	74	61	13	12	12	9,8	6,5	56
Tebutiuron	84	81	80	7,1	9,9	14	20	3,5	14
Simazina	81	78	84	13	15	8,7	17	17	8,7
Atrazina	119	69	86	11	16	10	31	27	17
Diuron	96	69	82	19	1,8	1,4	7,4	5,9	13
Ametrina	109	55	94	4,5	11	3,8	10	1,2	15

CARTUCHO NH2 LAB-MADE 10%

	Recuperação (%)			Repetibilidade (%)			Precisão intermediária (%)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Benomil	102	52	23	4,8	8,2	6,1	22	22	44
Tebutiuron	94	52	26	4,6	5,4	5,4	11	15	44
Simazina	113	91	33	3,5	14	2,2	23	9,1	21
Atrazina	72	62	88	20	15	4,0	29	17	8,4
Diuron	83	69	78	17	23	4,6	13	17	11
Ametrina	101	68	90	14	16	7,9	20	18	8,9

CARTUCHO C18 COMERCIAL

	Recuperação (%)			Repetibilidade (%)			Precisão intermediária (%)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Benomil	40	21	4,0	27	7,4	39	43	25	58
Tebutiuron	73	22	13	44	13	20	14	18	11
Simazina	35	72	15	25	7,2	12	30	1,4	24
Atrazina	55	64	44	24	4,6	15	1,6	23	15
Diuron	86	75	62	5,3	4,9	7,0	5,2	6,2	4,4
Ametrina	59	65	54	15	7,6	9,5	8,3	25	10

CARTUCHO C18 LAB-MADE

	Recuperação (%)			Repetibilidade (%)			Precisão intermediária (%)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Benomil	69	8,0	45	3,1	13	22	38	4,6	0,8
Tebutiuron	75	15	33	1,9	0,0	13	26	0,0	9,0
Simazina	60	20	27	14	7,8	0,0	18	4,6	0,0
Atrazina	76	37	36	18	8,8	27	24	1,6	28
Diuron	103	73	81	11	1,6	1,7	5,3	2,1	0,9
Ametrina	74	41	39	11	6,5	17	25	22	14

Tabela 22: Recuperações (n=6) e precisões (repetibilidade, n=6, e precisão intermediária, n=3) para pesticidas em tomate, em níveis de fortificação F1: 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, F2: 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e F3: 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, empregando cartuchos aminopropil comercial e *lab-made* (40% de carga de polímero) e octadecil comercial e *lab-made* (40% carga)

CARTUCHO NH₂ COMERCIAL

	Recuperação (%)			Repetibilidade (%)			Precisão intermediária (%)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Benomil	127	106	78	9,3	10	5,2	4,6	2,4	6,3
Tebutiuron	117	99	80	8,2	10	2,8	3,8	0,7	2,3
Simazina	106	81	94	20	32	8,8	16	41	10
Atrazina	127	89	101	20	14	8,6	2,4	0,5	8,7
Diuron	132	96	84	15	5,0	5,2	9,1	4,2	1,4
Ametrina	116	102	89	16	12	11	5,1	5,8	14

CARTUCHO NH₂ LAB-MADE 40%

	Recuperação (%)			Repetibilidade (%)			Precisão intermediária (%)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Benomil	59	60	45	21	15	10	26	3,7	1,2
Tebutiuron	82	67	48	19	15	7,7	5,8	13	2,0
Simazina	99	68	57	21	27	7,6	16	18	7,8
Atrazina	96	86	57	31	27	14	7,1	6,9	14
Diuron	67	52	57	15	31	13	13	24	8,3
Ametrina	83	70	64	21	36	26	8,8	32	31

CARTUCHO C18 COMERCIAL

	Recuperação (%)			Repetibilidade (%)			Precisão intermediária (%)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Benomil	49	29	10	6,6	9,2	22	1,0	6,1	27
Tebutiuron	59	32	17	20	15	21	12	8,7	1,4
Simazina	55	34	18	24	27	38	3,4	25	23
Atrazina	55	40	39	24	33	15	13	12	0,6
Diuron	53	40	39	8,2	32	34	0,4	11	4,2
Ametrina	61	57	55	25	55	22	5,4	62	19

CARTUCHO C18 LAB-MADE

	Recuperação (%)			Repetibilidade (%)			Precisão intermediária (%)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Benomil	63	29	6,0	14	7,3	12	14	39	11
Tebutiuron	65	29	10	19	20	16	21	1,2	16
Simazina	69	35	10	20	52	20	9,6	35	22
Atrazina	64	70	18	21	33	26	16	26	12
Diuron	63	46	27	18	12	32	3,0	17	27
Ametrina	61	37	28	17	27	42	10	5,1	49

Uvas: o método para análise de uvas, empregando cartucho NH_2 comercial (figura 18) apresenta uma baixa recuperação para o benomil, o que pode ser atribuído a sua alta polaridade, resultando em perda do analito durante as etapas de extração (baixa afinidade pelos solventes apolares – diclorometano e éter de petróleo – empregados). Como a recuperação no nível de fortificação F1 é maior do que nos níveis F2 e F3, parece que há um limite de massa de analito que passa para a fase orgânica; como em F2 e F3 as quantidades absolutas (em massa) são maiores, proporcionalmente as recuperações são menores. Nota-se também valores altos de repetibilidade e de precisão intermediária para o benomil nos níveis F2 e F3.

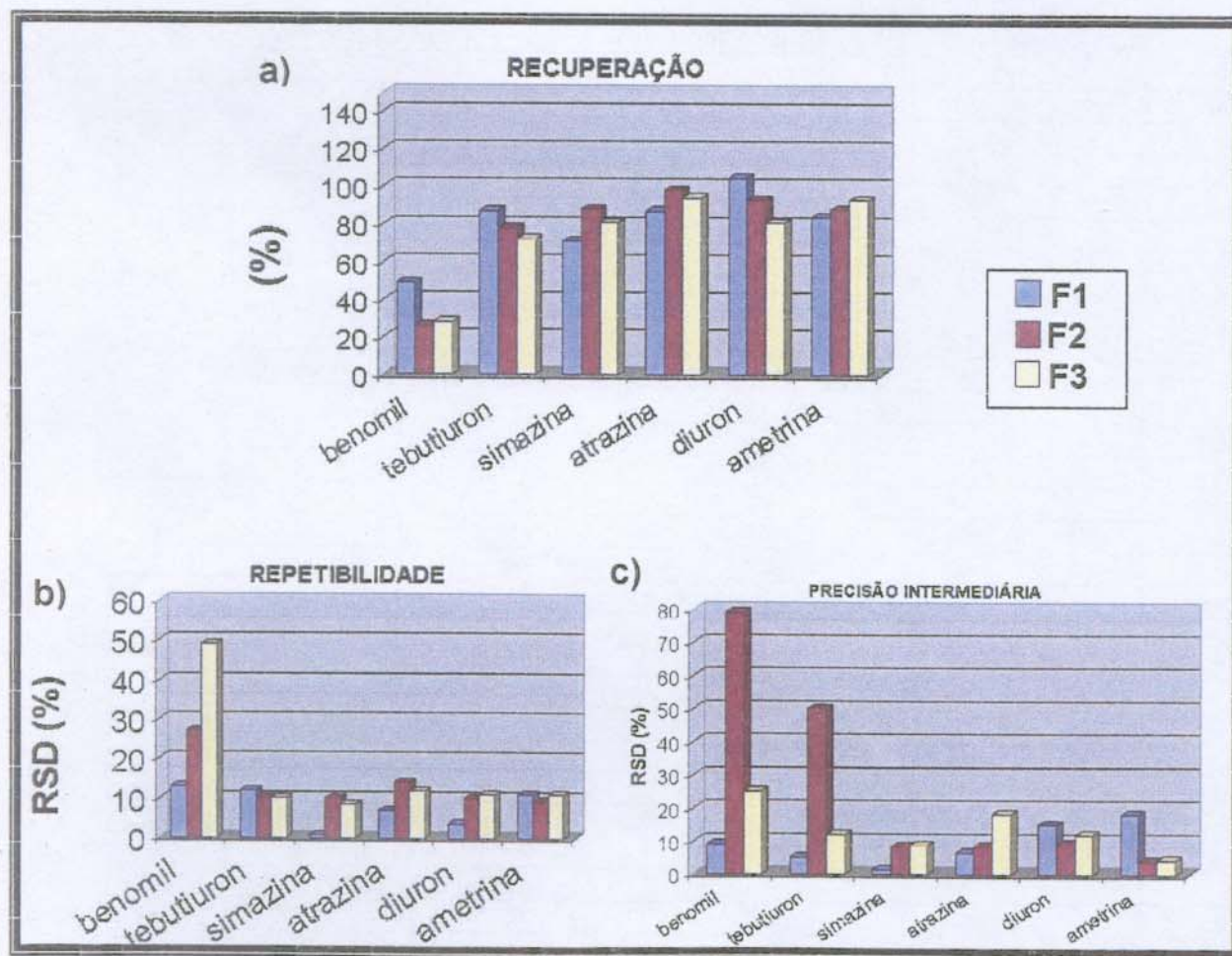


Figura 18: Resultados de (a) recuperação (%), (b) repetibilidade (RSD, em %) e (c) precisão intermediária (RSD, em %) para os pesticidas estudados. Extração em uvas, empregando cartucho aminopropil comercial; níveis de fortificação F1 ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$), F2 ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$) e F3 ($1000 \mu\text{g kg}^{-1}$)

Com cartucho NH_2 *lab-made* 40% (figura 19), a recuperação do benomil já sobe para valores aceitáveis nos níveis F2 e F3. O único resultado de recuperação fora do intervalo aceitável é para benomil em F1. Aqui, o que se observa (para benomil em F1) é o contrário do que ocorre com cartuchos NH_2 comerciais; esse valor alto de recuperação é atribuído à dificuldade na integração do pico, que aparece no início do cromatograma e, a esse nível, é de pequena intensidade. Como a matriz é complexa, o perfil cromatográfico pode variar de um experimento para outro, especialmente no início da corrida cromatográfica, dificultando a integração de picos que aparecem nessa região.

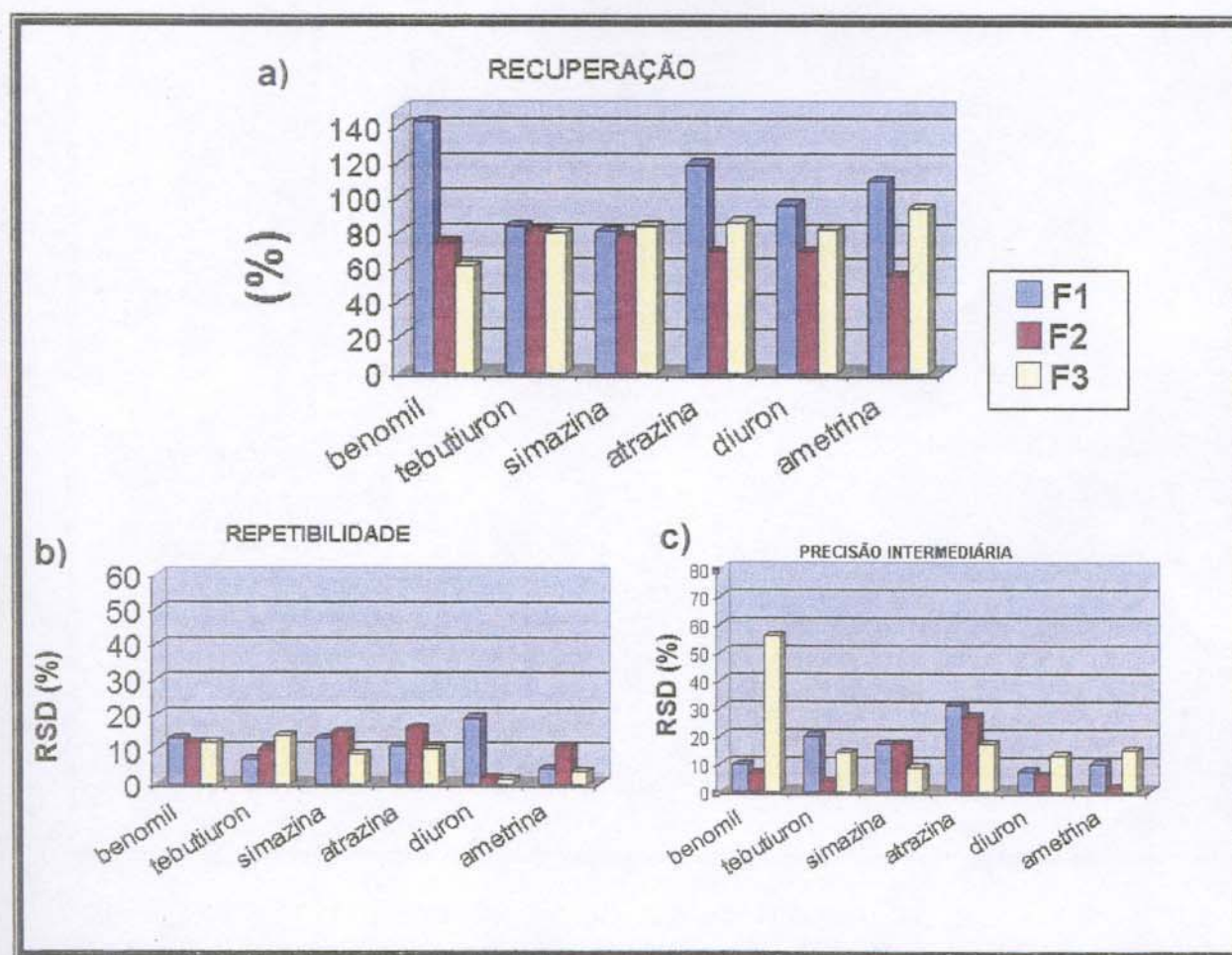


Figura 19: Resultados de (a) recuperação (%), (b) repetibilidade (RSD, em %) e (c) precisão intermediária (RSD, em %) para os pesticidas estudados. Extração em uvas, empregando cartucho aminopropil *lab-made* 40%; níveis de fortificação F1 ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$), F2 ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$) e F3 ($1000 \mu\text{g kg}^{-1}$)

Os resultados para cartuchos NH_2 *lab-made* 10% (figura 20) mostram uma piora nas recuperações dos pesticidas polares (benomil, tebutiuron e simazina) ao nível de fortificação F3 e valores de precisão elevadas em vários casos. Como, de modo geral, o desempenho foi pior que para os cartuchos *lab-made* 40%, os cartuchos *lab-made* 10% não foram considerados adequados, provavelmente devido ao baixo recobrimento, ocasionando retenção dos pesticidas mais polares nos grupos silanóis da sílica. Sendo assim, não foram empregados nas análises de tomate.

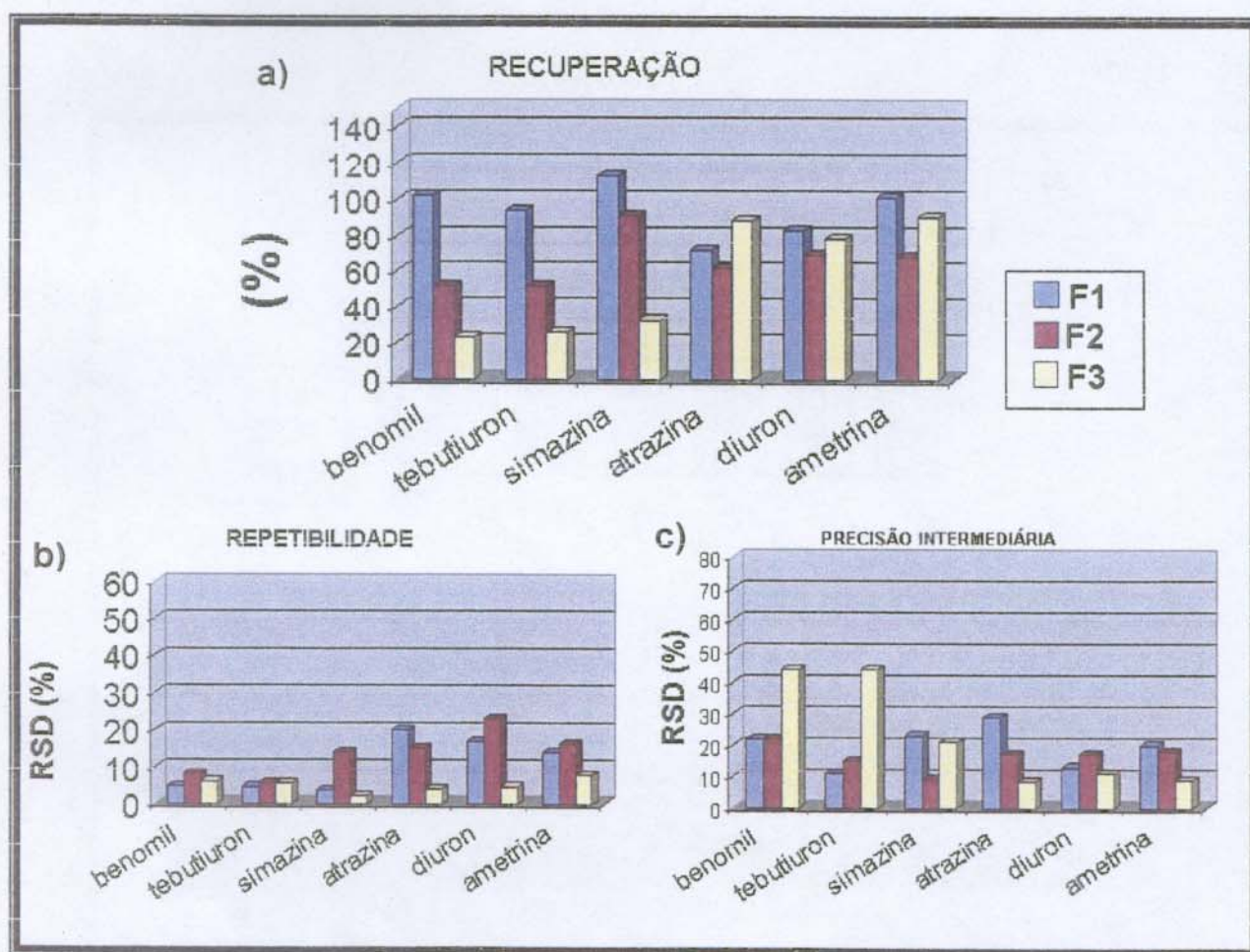


Figura 20: Resultados de (a) recuperação (%), (b) repetibilidade (RSD, em %) e (c) precisão intermediária (RSD, em %) para os pesticidas estudados. Extração em uvas, empregando cartucho NH_2 *lab-made* 10%; níveis de fortificação F1 ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$), F2 ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$) e F3 ($1000 \mu\text{g kg}^{-1}$)

Os métodos com cartuchos C18 comerciais e *lab-made* tiveram pior desempenho que os NH₂ para análise de pesticidas em uva. No caso dos C18 comerciais (figura 21), apesar de inadequados para ambiente multirresíduo, apresentaram resultados aceitáveis para diuron, em termos de recuperação e precisão. Isto pode ser explicado pela alta afinidade que o diuron têm com o material apolar que constitui as fases sólidas, ao passo que os pesticidas de maior polaridade têm baixa afinidade e não ficam suficientemente retidos nos cartuchos, durante a etapa de pré-concentração. O mesmo acontece para ametrina, que apresenta bons resultados de recuperação e precisão para a maioria dos experimentos.

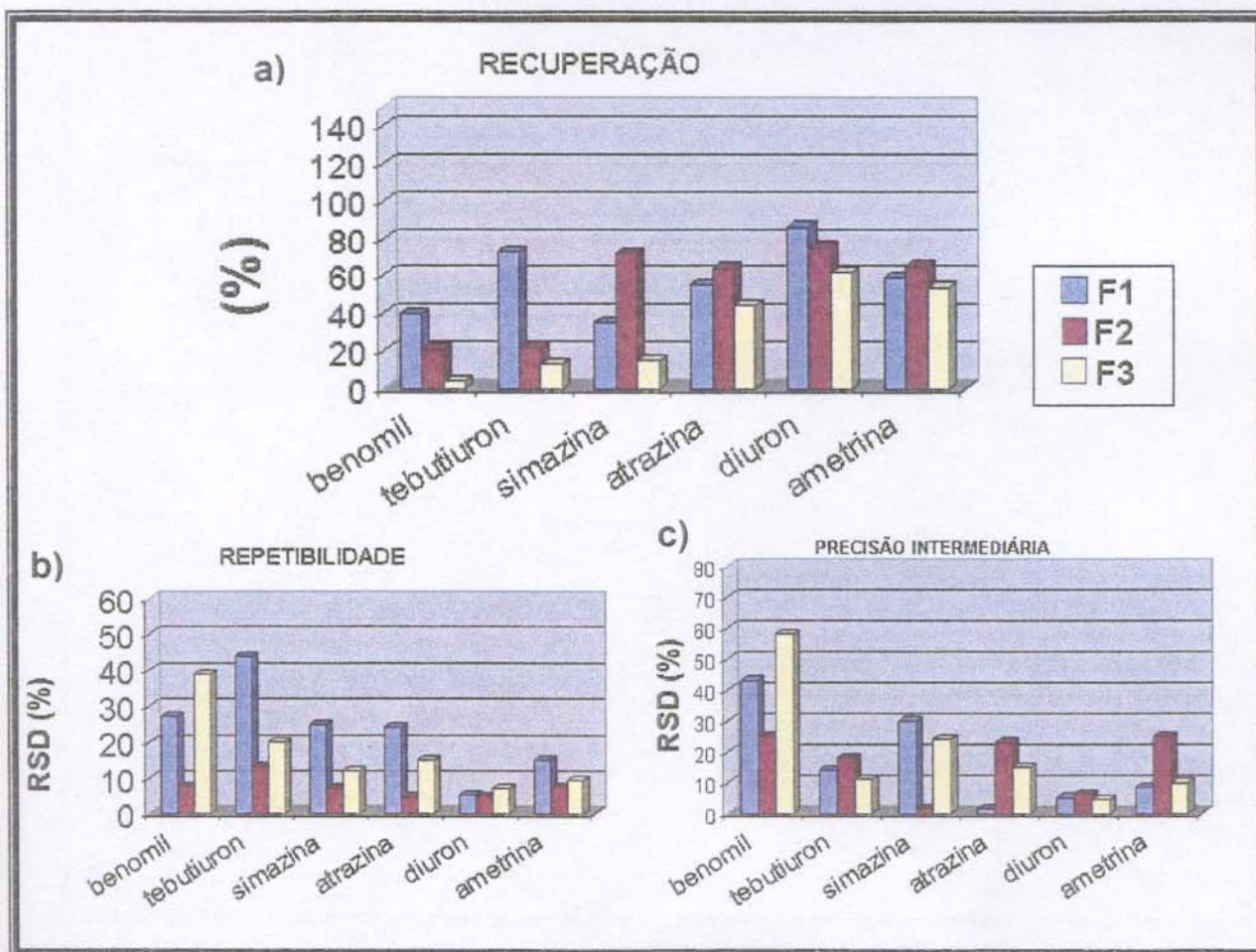


Figura 21: Resultados de (a) recuperação (%), (b) repetibilidade (RSD, em %) e (c) precisão intermediária (RSD, em %) para os pesticidas estudados. Extração em uvas, empregando cartucho octadecil comercial; níveis de fortificação F1 (100 µg kg⁻¹), F2 (200 µg kg⁻¹) e F3 (1000 µg kg⁻¹)

Para os cartuchos C18 *lab-made* (figura 22), as recuperações são adequadas para o diuron (em todos os níveis) e também em ambiente multirresíduo ao nível F1.

A semelhança entre os resultados para cartuchos C18 comercial e *lab-made* pode ser atribuída ao alto teor de carbono que ambos os sorventes possuem (tabela 10), constituindo assim materiais altamente apolares, com poucos grupos silanóis residuais disponíveis para promover a interação com os pesticidas de maior polaridade.

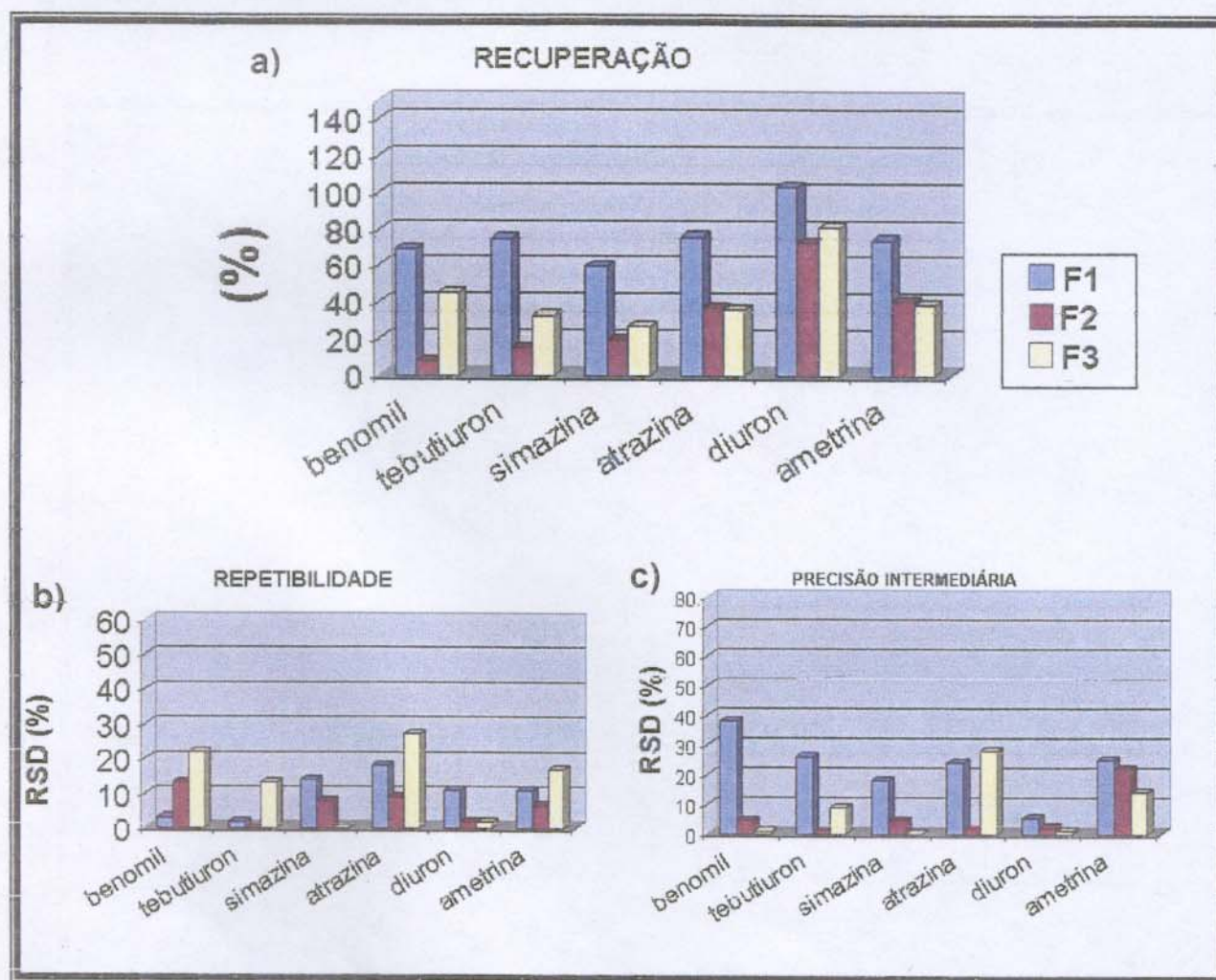


Figura 22: Resultados de (a) recuperação (%), (b) repetibilidade (RSD, em %) e (c) precisão intermediária (RSD, em %) para os pesticidas estudados. Extração em uvas, empregando cartucho C18 *lab-made* 40%; níveis de fortificação F1 ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$), F2 ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$) e F3 ($1000 \mu\text{g kg}^{-1}$)

Tomates: os métodos para tomate empregando cartuchos NH_2 (figuras 23 e 24) apresentaram, de um modo geral, bons resultados. Os sorventes NH_2 *lab-made* 40% forneceram melhores resultados de recuperação, enquanto os NH_2 comerciais apresentaram recuperações altas no nível F1, possivelmente devido a problemas com a integração dos picos. As fases *lab-made* 40% tiveram melhores resultados de recuperação, pois esse material, além dos sítios polares do tipo aminopropil, possui uma forte característica apolar, devido às cadeias poliméricas, fazendo também o trabalho de reter impurezas de polaridade intermediária.

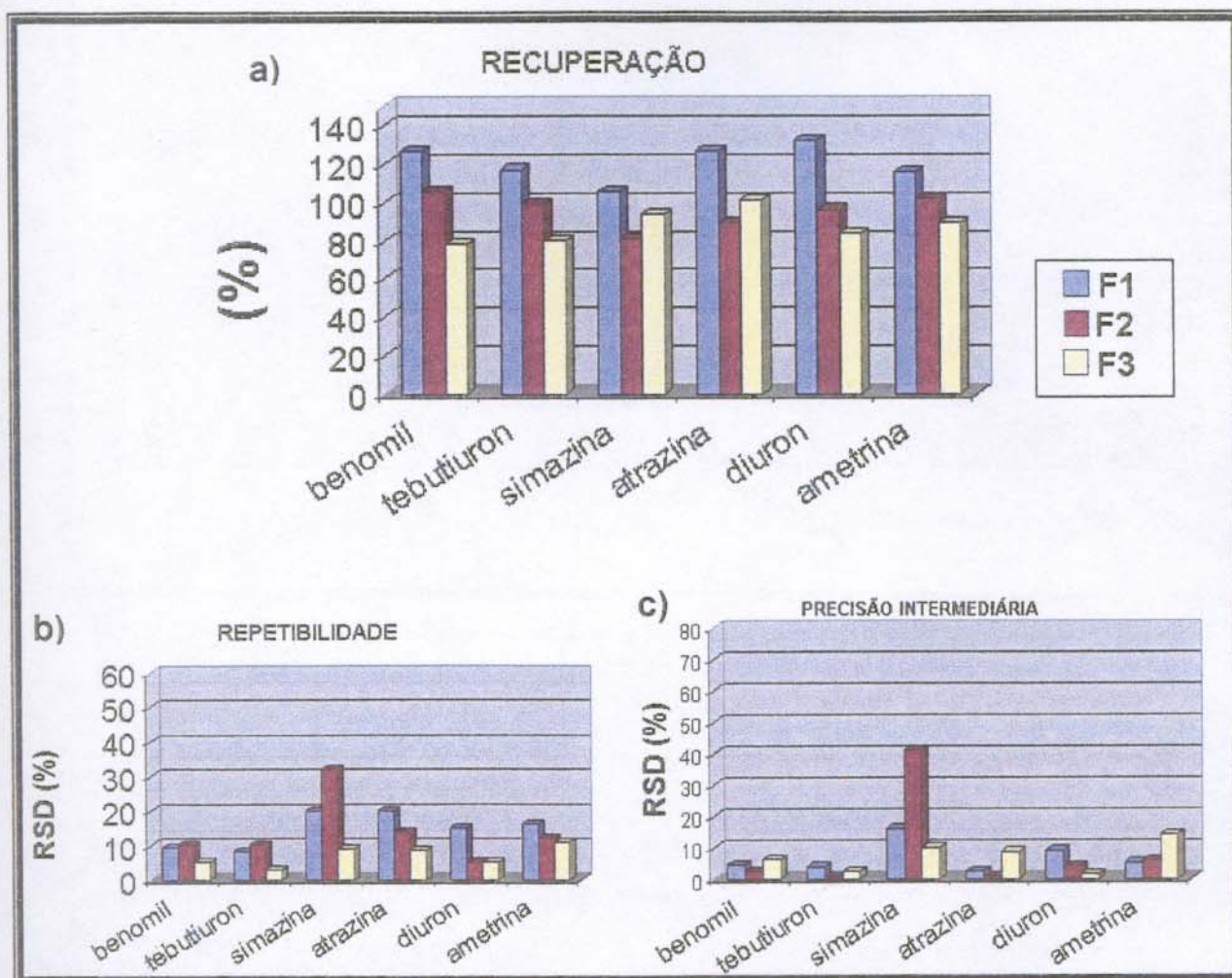


Figura 23: Resultados de (a) recuperação (%), (b) repetibilidade (RSD, em %) e (c) precisão intermediária (RSD, em %) para os pesticidas estudados. Extração em tomates, empregando cartucho aminopropil comercial; níveis de fortificação F1 ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$), F2 ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$) e F3 ($1000 \mu\text{g kg}^{-1}$)

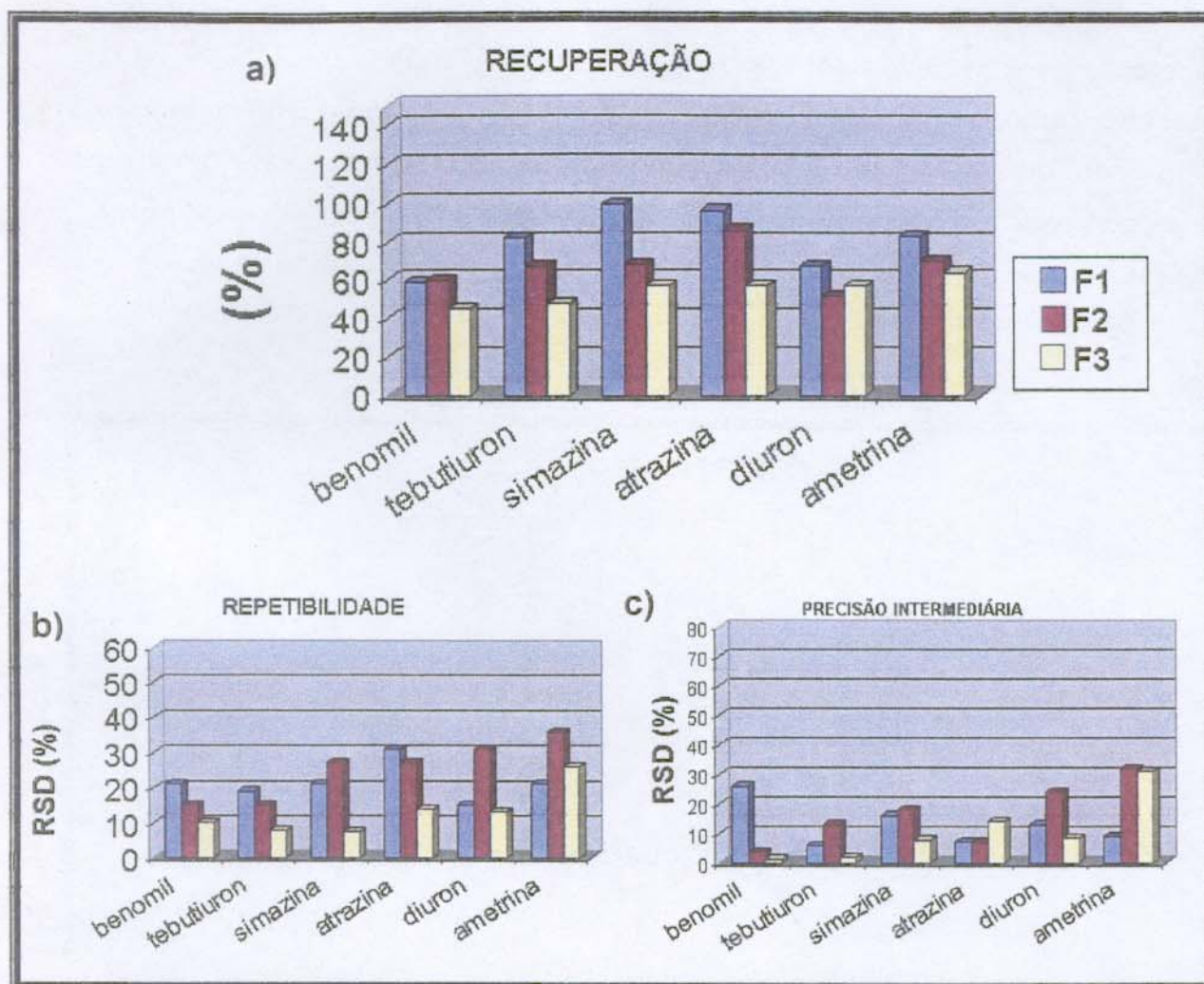


Figura 24: Resultados de (a) recuperação (%), (b) repetibilidade (RSD, em %) e (c) precisão intermediária (RSD, em %) para os pesticidas estudados. Extração em tomates, empregando cartucho aminopropil *lab-made* 40%; níveis de fortificação F1 ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$), F2 ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$) e F3 ($1000 \mu\text{g kg}^{-1}$)

Com cartuchos C18 (figuras 25 e 26), tanto para comerciais como para *lab-made*, o desempenho é inadequado de forma geral, sendo recomendado apenas com relação à recuperação ao nível F1, com ligeiro destaque para as fases *lab-made*.

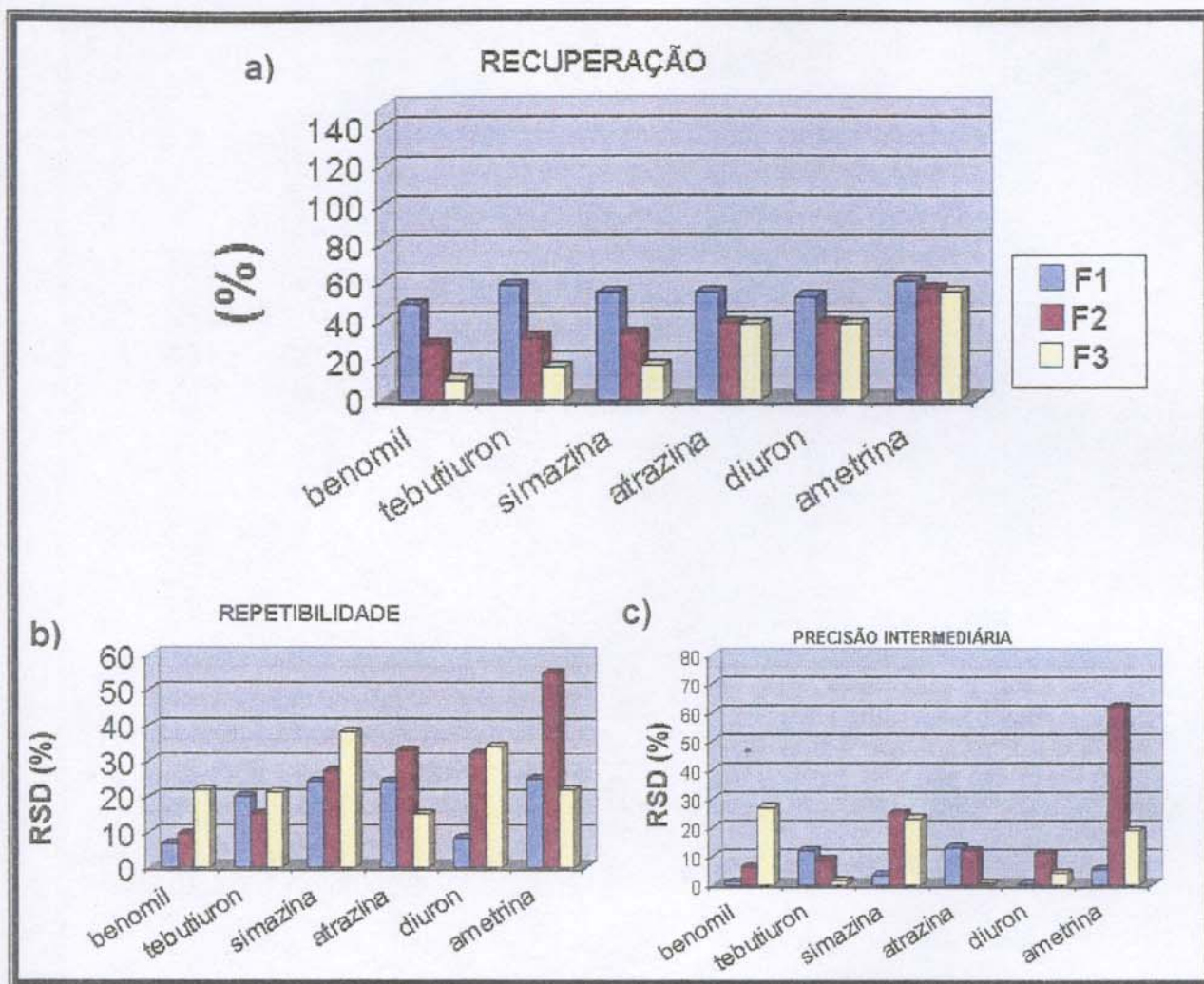


Figura 25: Resultados de (a) recuperação (%), (b) repetibilidade (RSD, em %) e (c) precisão intermediária (RSD, em %) para os pesticidas estudados. Extração em tomates, empregando cartucho octadecil comercial; níveis de fortificação F1 ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$), F2 ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$) e F3 ($1000 \mu\text{g kg}^{-1}$)

Os resultados das tabelas 21 e 22 foram dispostos na forma de tabelas de acertos (tabelas 23 e 24). Estas tabelas mostram, para cada cartucho estudado, o número de resultados que ficaram dentro dos intervalos de aceitabilidade para recuperação, repetibilidade e precisão intermediária (tabela 23), cada um dos níveis de fortificação (tabela 23) e para cada um dos pesticidas estudados (tabela 24).

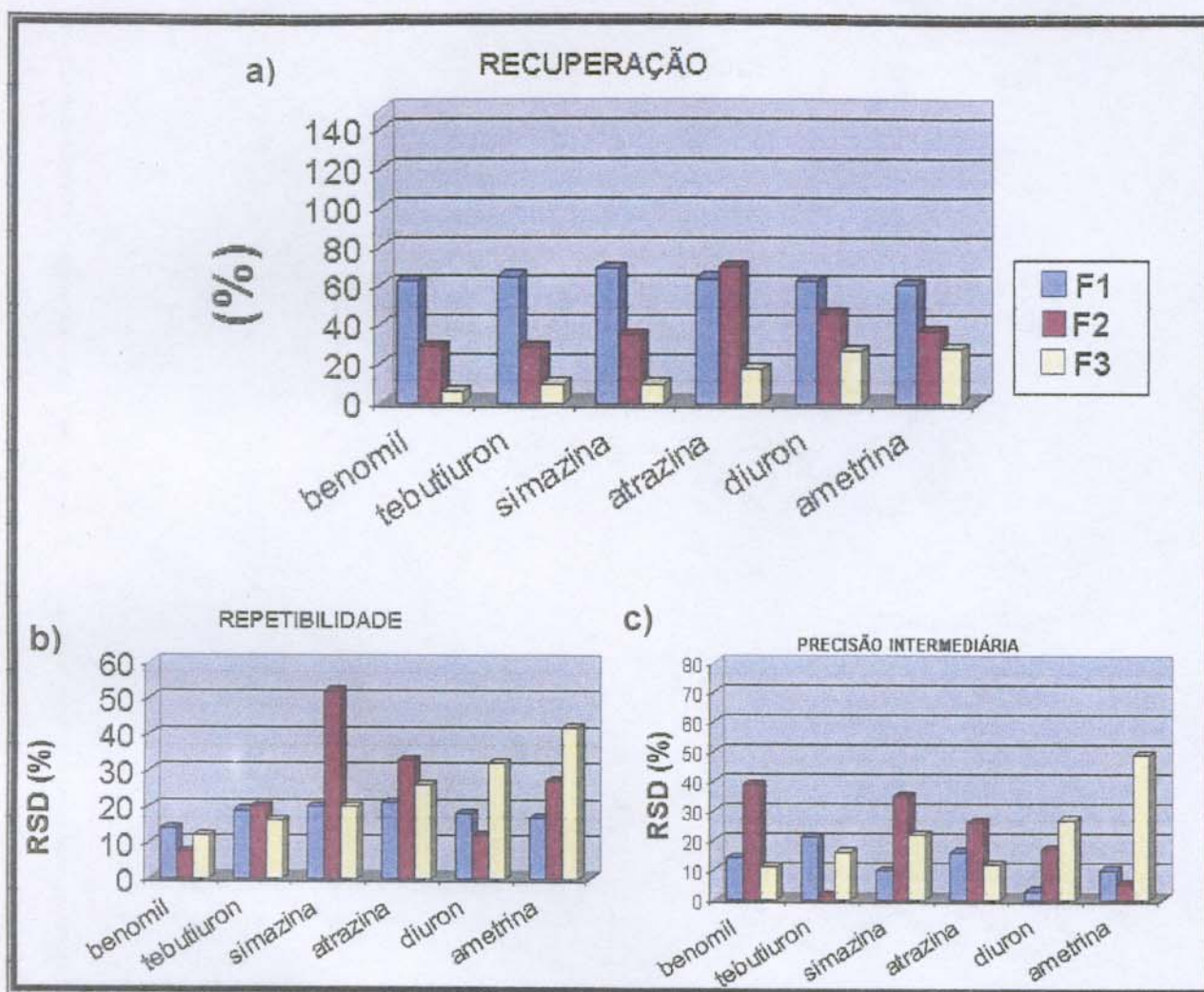


Figura 26: Resultados de (a) recuperação (%), (b) repetibilidade (RSD, em %) e (c) precisão intermediária (RSD, em %) para os pesticidas estudados. Extração em tomates, empregando cartucho C18 *lab-made*; níveis de fortificação F1 (100 µg kg⁻¹), F2 (200 µg kg⁻¹) e F3 (1000 µg kg⁻¹)

A tabela 23 confirma o melhor desempenho dos cartuchos NH₂ tanto para uva quanto para tomate, com os cartuchos NH₂ *lab-made* oferecendo os melhores resultados de recuperação.

A tabela 24 vista ao longo das linhas indica o desempenho dos cartuchos para um ambiente multirresíduo. Novamente os cartuchos NH₂ *lab-made* mostram os melhores resultados. Observando cada coluna separadamente, tem-se uma análise do desempenho dos cartuchos para análise unirresidual. Nota-se que, para o diuron em uva, tanto os materiais aminopropil quanto octadecil comercial e *lab-made* são adequados.

Tabela 23: Número de resultados dentro dos intervalos de exatidão e precisão aceitáveis. Máximo de 18 resultados possíveis para cada parâmetro e nível de fortificação

Matriz	Fase sólida	Recuperação	Repetibilidade	Precisão intermediária	F1	F2	F3
Uva	NH ₂ comercial	15	16	13	16	14	14
Uva	NH ₂ <i>lab-made</i> 40%	17	16	12	13	15	17
Uva	NH ₂ <i>lab-made</i> 10%	15	14	07	12	12	12
Uva	C18 comercial	10	12	10	10	12	10
Uva	C18 <i>lab-made</i>	08	14	11	02	12	09
Tomate	NH ₂ comercial	15	14	16	11	16	18
Tomate	NH ₂ <i>lab-made</i> 40%	16	08	12	11	11	14
Tomate	C18 comercial	07	05	13	13	07	05
Tomate	C18 <i>lab-made</i>	07	04	08	11	05	03

Tabela 24: Número de resultados dentro dos intervalos de exatidão e precisão aceitáveis. Máximo de 09 resultados possíveis para cada pesticida

Matriz	Fase sólida	Benomil	Tebutiuron	Simazina	Atrazina	Diuron	Ametrina
Uva	NH ₂ comercial	2	8	9	8	9	8
Uva	NH ₂ <i>lab-made</i> 40%	7	8	7	6	8	9
Uva	NH ₂ <i>lab-made</i> 10%	5	7	6	6	6	6
Uva	C18 comercial	1	4	4	6	9	8
Uva	C18 <i>lab-made</i>	5	6	6	3	9	4
Tomate	NH ₂ comercial	8	9	5	7	8	8
Tomate	NH ₂ <i>lab-made</i> 40%	6	7	5	7	7	4
Tomate	C18 comercial	4	5	2	5	5	4
Tomate	C18 <i>lab-made</i>	6	2	2	3	3	3

Com bases nos resultados obtidos, pode-se observar nitidamente que, dentre os materiais *lab-made*, as fases aminopropil 40% tiveram melhor desempenho, seguidas pelas aminopropil 10% e depois pelas octadecil.

Em termos de polaridade, tem-se que NH₂ 10% é mais polar que NH₂ 40%, que é mais polar que C18 (estes resultados são confirmados pela análise de carbono – tabela 10). Se a polaridade fosse o único parâmetro que comandasse o desempenho dos materiais, o resultado esperado seguiria esta seqüência. Porém, NH₂ 40% é melhor que NH₂ 10%, indicando que o efeito do número de grupos amino também contribui para o desempenho do sorvente, bem como os silanóis residuais. A quantidade de carbono e de silanóis residuais em NH₂ 40% é menor que em NH₂ 10%, porém a quantidade de grupos amino é maior.

As fases sólidas NH_2 preparadas podem ser um tipo de sorvente de modo misto (*mixed-mode sorbent*): possuem características apolares devido ao esqueleto polimérico e características polares por causa das terminações aminopropil, apresentando tanto interações polares quanto apolares e se adaptando a diferentes ambientes.

Os materiais aminopropil convencionais estão no limiar entre polar (fase normal) e trocador iônico. Servem como fase normal para extração de compostos polares, pigmentos fenólicos, drogas e metabólitos e como trocador aniônico fraco de carboidratos, ânions fracos e ácidos orgânicos [163].

Os materiais aminopropil desenvolvidos têm, acrescentadas à estas características, a capacidade hidrofóbica que a cadeia polimérica carbônica confere a estes materiais.

Análise de Uvas e Tomates do Varejo

Utilizando as metodologias que apresentaram melhores resultados (cartuchos aminopropil comercial e *lab-made* 40%), foram analisadas uvas e tomates comercializados no varejo, com o objetivo de verificar a presença de pesticidas.

As figuras 27 a 32 mostram cromatogramas de uvas e tomates analisados. Cada cromatograma corresponde a uma amostra preparada independentemente das outras.

A figura 27 mostra cromatogramas de uvas analisadas com cartucho NH_2 comercial e a figura 28 com NH_2 *lab-made* 40%. A figura 29 mostra uma amostra de uva onde há maior indício da presença de pesticida, referente ao pico em 4,33 minutos. O espectro do pico indica absorção máxima em 220 nm, que é o máximo de absorção das triazinas. Porém, sem o auxílio de um detector com espectrômetro de massas, a identificação precisa do analito não é possível, pois vários pesticidas (especialmente as triazinas) têm espectro semelhante, com absorção máxima em 220 nm.

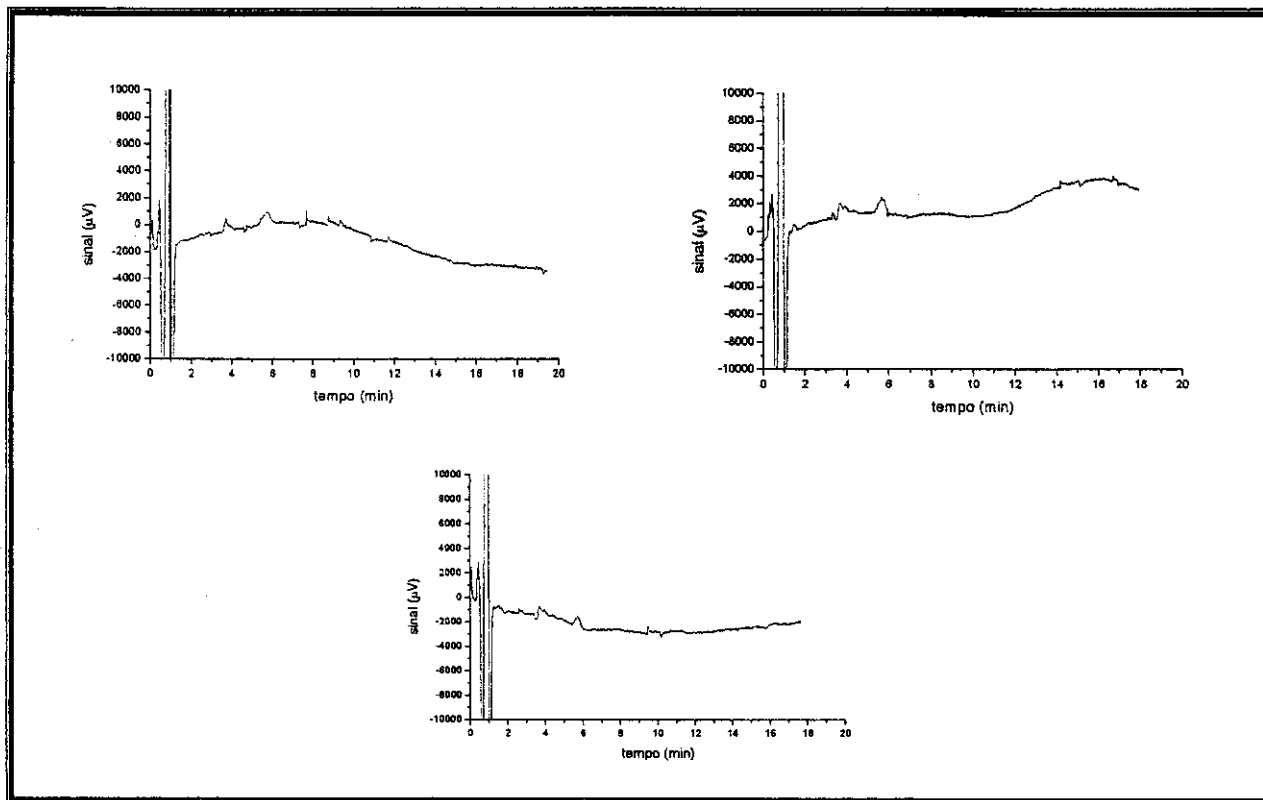


Figura 27: Cromatogramas de amostras de uva do varejo analisadas pela metodologia desenvolvida para cartuchos de aminopropil comercial. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 µL; coluna Purospher RP-18 125 x 3 mm, com coluna de guarda; fase móvel CH₃CN:solução aquosa de NH₄OH 0,01% (pH 8,4) (35:65, v/v); vazão: 0,7 mL min⁻¹; detecção: 235 nm

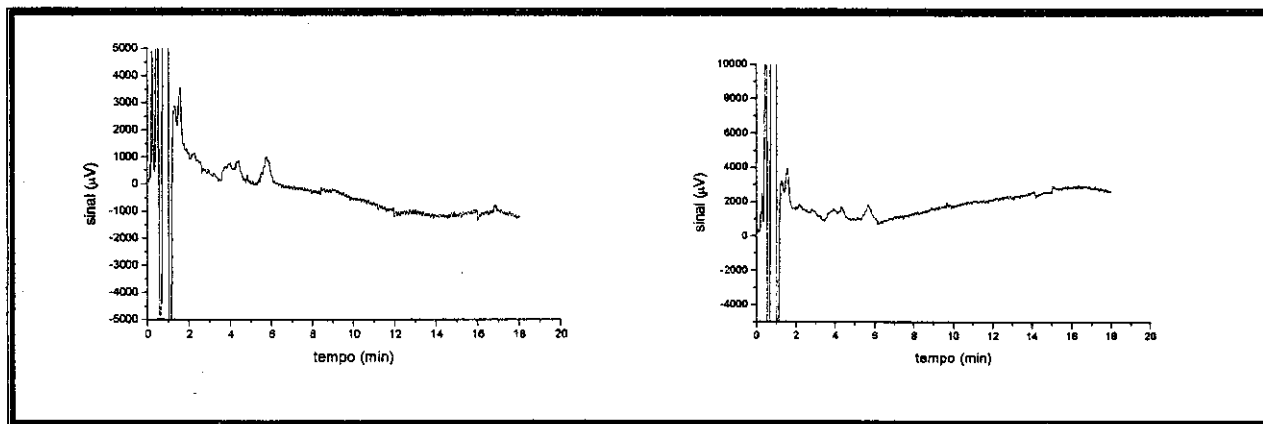


Figura 28: Cromatogramas de amostras de uva do varejo analisadas pela metodologia desenvolvida para cartuchos de aminopropil *lab-made* 40%. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 µL; coluna Purospher RP-18 125 x 3 mm, com coluna de guarda; fase móvel CH₃CN:solução aquosa de NH₄OH 0,01% (pH 8,4) (35:65, v/v); vazão: 0,7 mL min⁻¹; detecção: 235 nm

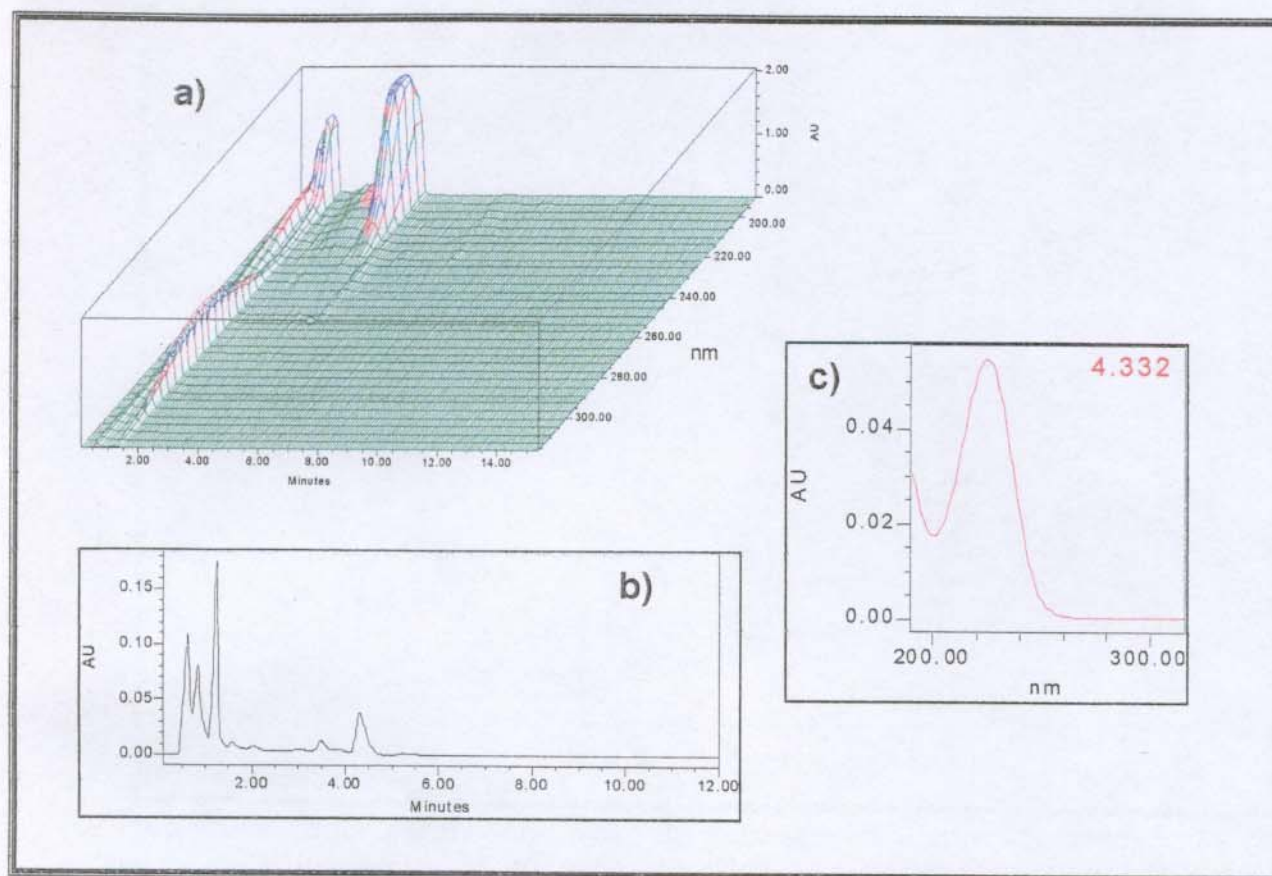


Figura 29: Cromatogramas de amostras de uva do varejo analisadas pela metodologia desenvolvida para cartuchos de aminopropil *lab-made* 40%. **a)** detecção por arranjo de diodos (190-320 nm); **b)** detecção em 235 nm; **c)** espectro do pico em 4,33 min. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; coluna Purospher RP-18 125 x 3 mm, com coluna de guarda; fase móvel CH_3CN :solução aquosa de NH_4OH 0,01% (pH 8,4) (35:65, v/v); vazão: 0,7 mL min^{-1}

A figura 30 mostra cromatogramas de tomates analisados com cartucho NH_2 comercial e a figura 31 com NH_2 *lab-made* 40%. A figura 32 mostra uma amostra de tomate onde há maior indício da presença de pesticida, referente ao pico em 4,18 minutos. O espectro do pico indica absorção máxima em 220 nm, que é o máximo de absorção das triazinas.

Tanto para uvas como para tomates, a presença de uma linha de base sem picos de interferentes e relativamente estável indica que as metodologias são adequadas com relação ao *clean-up* da amostra, fator necessário para garantir uma boa seletividade na separação.

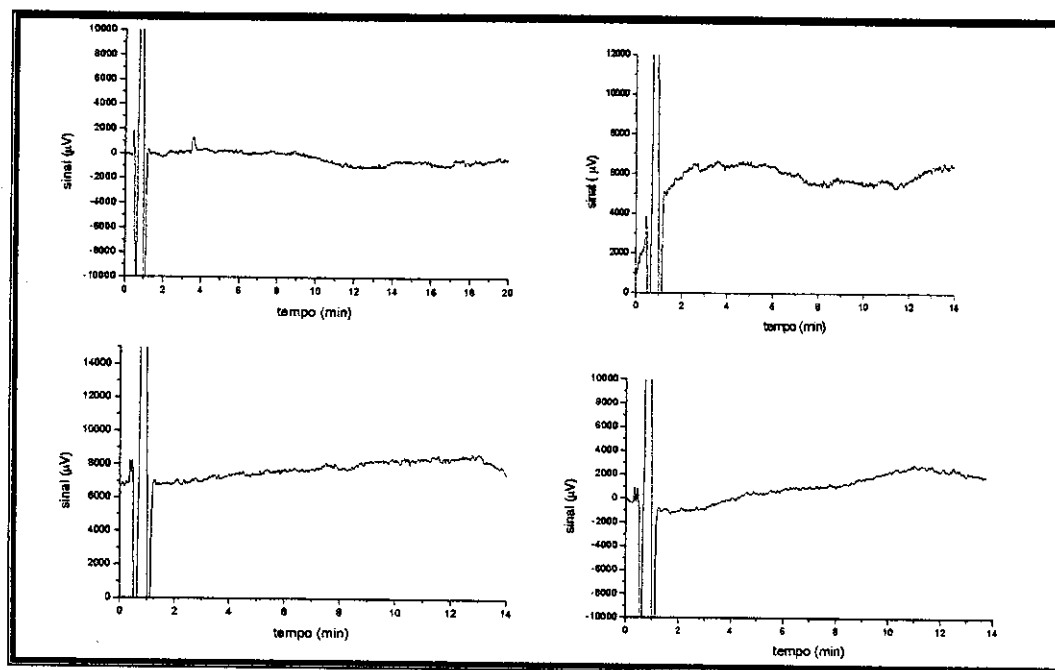


Figura 30: Cromatogramas de amostras de tomate do varejo analisadas pela metodologia desenvolvida para cartuchos de aminopropil comercial. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 µL; coluna Purospher RP-18 125 x 3 mm, com coluna de guarda; fase móvel CH₃CN:solução aquosa de NH₄OH 0,01% (pH 8,4) (35:65, v/v); vazão: 0,7 mL min⁻¹; detecção: 235 nm

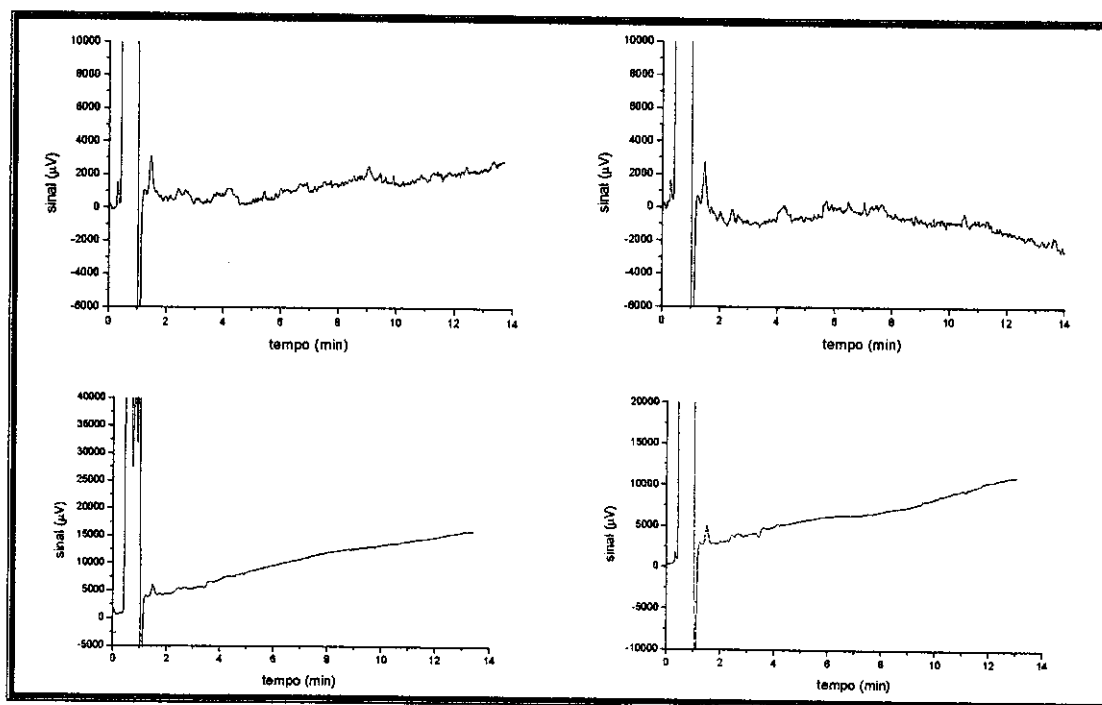


Figura 31: Cromatogramas de amostras de tomate do varejo analisadas pela metodologia desenvolvida para cartuchos de aminopropil *lab-made* 40%. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 µL; coluna Purospher RP-18 125 x 3 mm, com coluna de guarda; fase móvel CH₃CN:solução aquosa de NH₄OH 0,01% (pH 8,4) (35:65, v/v); vazão: 0,7 mL min⁻¹; detecção: 235 nm

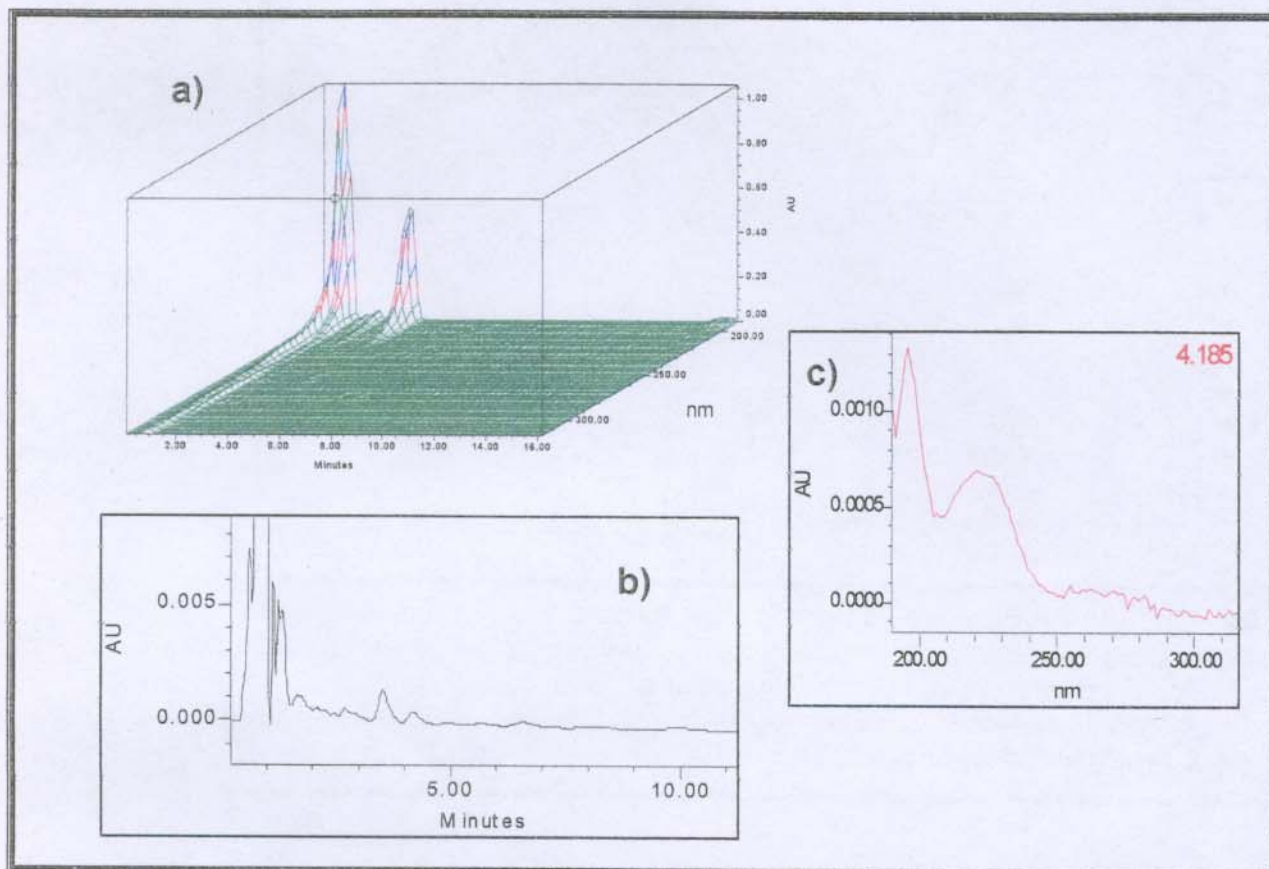


Figura 32: Cromatogramas de amostras de tomate do varejo analisadas pela metodologia desenvolvida para cartuchos de aminopropil comercial. **a)** detecção por arranjo de diodos (190-320 nm); **b)** detecção em 235 nm; **c)** espectro do pico em 4,18 min. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; coluna Purospher RP-18 125 x 3 mm, com coluna de guarda; fase móvel CH_3CN :solução aquosa de NH_4OH 0,01% (pH 8,4) (35:65, v/v); vazão: 0,7 mL min^{-1}

Análise de uvas e tomates do varejo com fortificação das amostras

A figura 33 mostra cromatogramas de uvas e tomates do varejo analisadas com cartucho NH_2 comercial e *lab-made* 40%, incluindo a etapa de fortificação, ao nível F1. Os cromatogramas mostram seletividade bastante adequada, tendo em vista a concentração de analito e a complexidade da amostra e nas figuras 33b e 33d nota-se o problema com a integração do pico do benomil, no início da corrida cromatográfica.

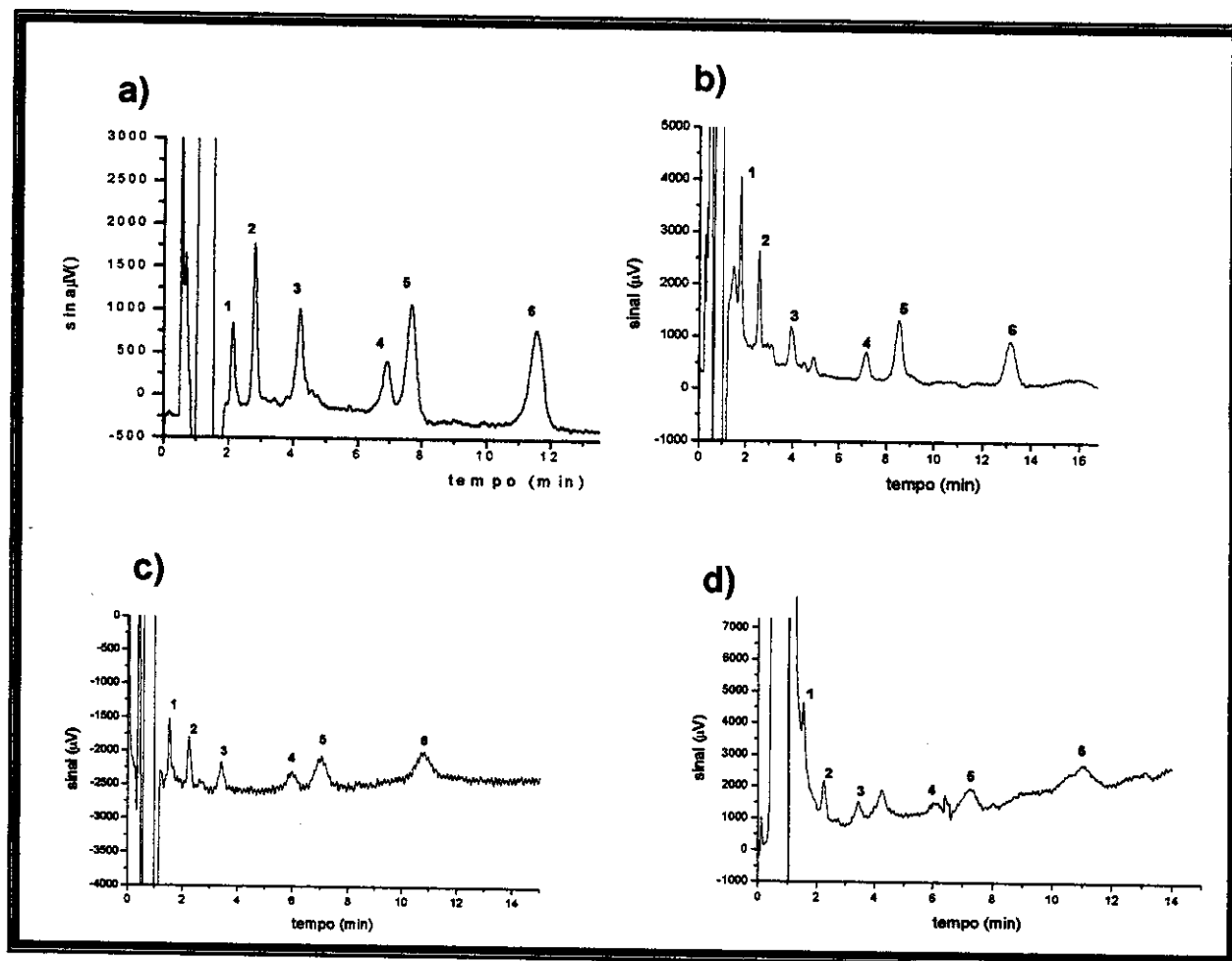


Figura 33: Cromatogramas de amostras de uva (a e b) e tomate (c e d) do varejo analisadas pela metodologia desenvolvida para cartuchos de aminopropil comercial (a e c) e *lab-made* 40% (b e d); nível de fortificação F1. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 µL; coluna Purospher RP-18 125 x 3 mm, com coluna de guarda; fase móvel CH₃CN:solução aquosa de NH₄OH 0,01% (pH 8,4) (35:65, v/v); vazão: 0,7 mL min⁻¹; detecção: 235 nm. Pesticidas: (1) benomil, (2) tebutiuron, (3) simazina, (4) atrazina, (5) diuron, (6) ametrina

A tabela 25 mostra os resultados de recuperação e repetibilidade, para cada um dos experimentos realizados. Para todos os casos, tanto para recuperação quanto para repetibilidade, nota-se uma total concordância com os resultados das tabelas 21 e 22, relativas ao desenvolvimento das metodologias, realizadas com amostras-testemunha, mostrando que as metodologias desenvolvidas com cartuchos aminopropil comercial e *lab-made* 40% se aplicam satisfatoriamente à análise dos pesticidas estudados em uvas e tomates do varejo.

Tabela 25: Recuperações e repetibilidades (n=3) para pesticidas em uva e tomate do varejo, em nível de fortificação F1: 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, empregando cartuchos aminopropil comercial e *lab-made*

UVA - AMINOPROPIL COMERCIAL		
Pesticida	Recuperação	Repetibilidade
Benomil	38	37
Tebutiuron	76	0,8
Simazina	65	15
Atrazina	78	33
Diuron	103	5,1
Ametrina	82	5,3
UVA - AMINOPROPIL LAB-MADE 40%		
Pesticida	Recuperação	Repetibilidade
Benomil	181	14
Tebutiuron	106	2,9
Simazina	77	16
Atrazina	76	7,3
Diuron	96	6,8
Ametrina	102	11
TOMATE - AMINOPROPIL COMERCIAL		
Pesticida	Recuperação	Repetibilidade
Benomil	123	14
Tebutiuron	114	8,3
Simazina	118	13
Atrazina	129	13
Diuron	123	6,0
Ametrina	112	13
TOMATE - AMINOPROPIL LAB-MADE 40%		
Pesticida	Recuperação	Repetibilidade
Benomil	70	3,3
Tebutiuron	78	18
Simazina	110	9,1
Atrazina	91	43
Diuron	61	16
Ametrina	78	22

Estudo sobre o Efeito da Matriz

O estudo sobre efeito da matriz foi realizado conforme descrito no item "Calibração na matriz", do capítulo 3 (pag. 45). Foram feitas curvas analíticas com o extrato de uva e tomate submetidos aos procedimentos em cartuchos aminopropil e octadecil comerciais.

As figuras 34 a 37 mostram os cromatogramas obtidos com detecção por

arranjo de diodos, entre 190 e 320 nm e um cromatograma no comprimento de onda de 235 nm. Observa-se, para todos os casos, seletividade adequada e presença de poucos interferentes.

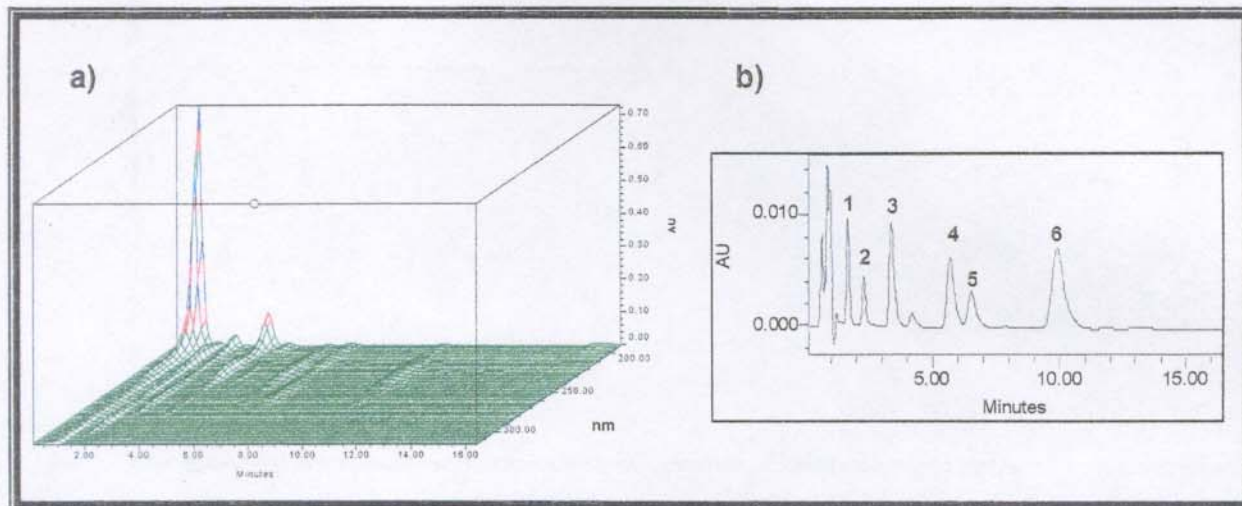


Figura 34: Cromatogramas referentes ao estudo de calibração na matriz. **a)** detecção por arranjo de diodos (190-320 nm); **b)** detecção em 235 nm; matriz: uva; cartucho aminopropil comercial. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; coluna Purospher RP-18 125 x 3 mm, com coluna de guarda; fase móvel CH_3CN :solução aquosa de NH_4OH 0,01% (pH 8,4) (35:65, v/v); vazão: 0,7 mL min^{-1} . Pesticidas (concentração de 2 mg L^{-1}): (1) benomil, (2) tebutiuron, (3) simazina, (4) atrazina, (5) diuron, (6) ametrina

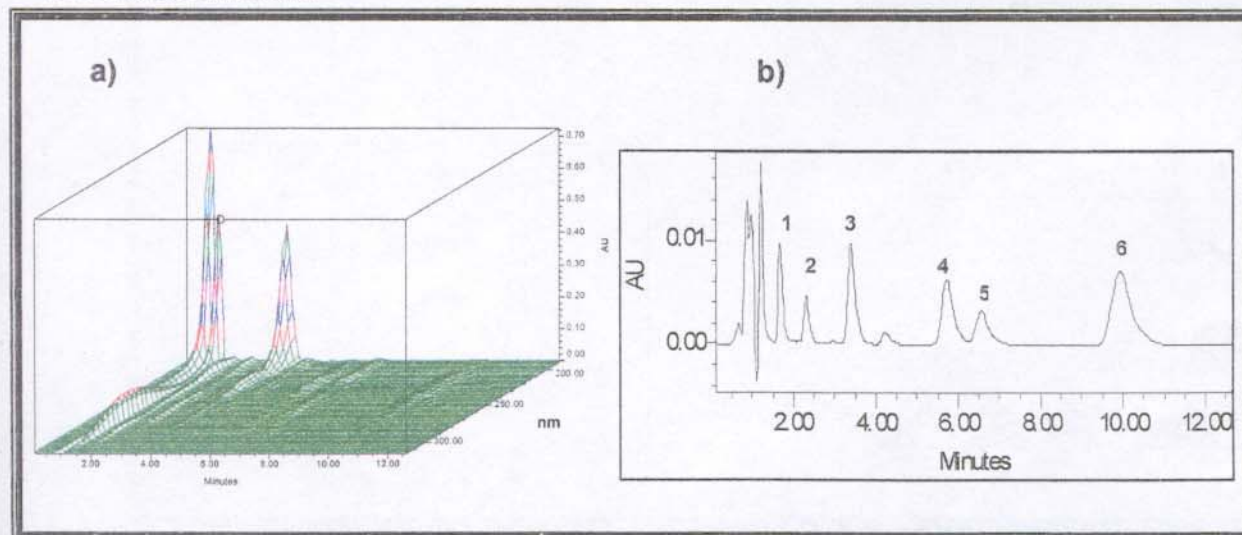


Figura 35: Cromatogramas referentes ao estudo de calibração na matriz. **a)** detecção por arranjo de diodos (190-320 nm); **b)** detecção em 235 nm; matriz: tomate; cartucho aminopropil comercial. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; coluna Purospher RP-18 125 x 3 mm, com coluna de guarda; fase móvel CH_3CN :solução aquosa de NH_4OH 0,01% (pH 8,4) (35:65, v/v); vazão: 0,7 mL min^{-1} . Pesticidas (concentração de 2 mg L^{-1}): (1) benomil, (2) tebutiuron, (3) simazina, (4) atrazina, (5) diuron, (6) ametrina

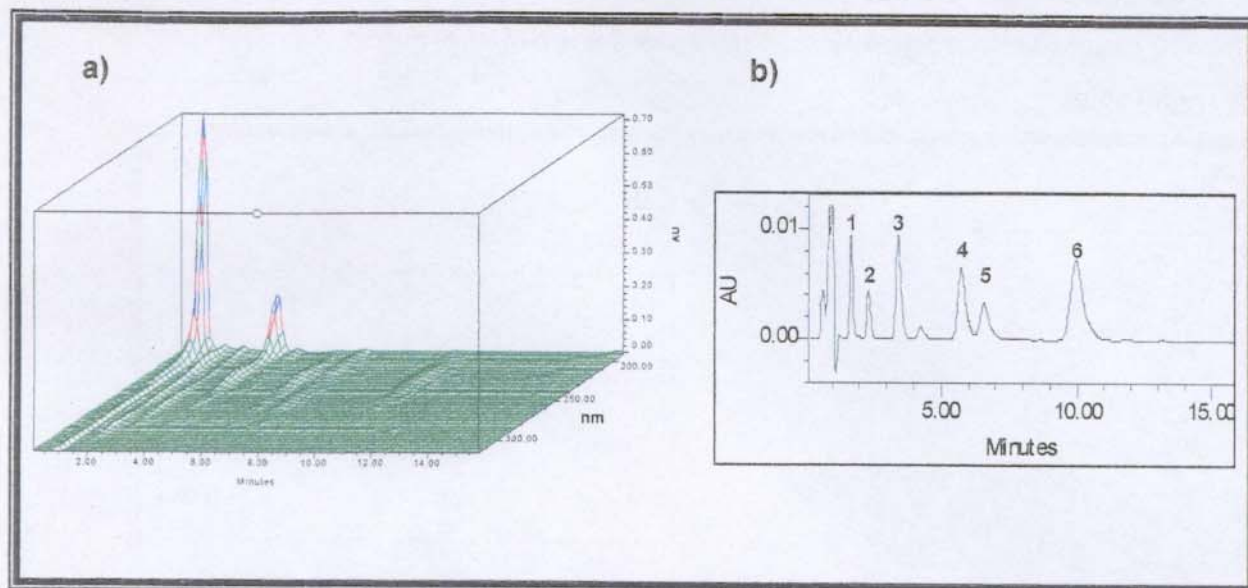


Figura 36: Cromatogramas referentes ao estudo de calibração na matriz. **a)** detecção por arranjo de diodos (190-320 nm); **b)** detecção em 235 nm; matriz: uva; cartucho octadecil comercial. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; coluna Purospher RP-18 125 x 3 mm, com coluna de guarda; fase móvel CH_3CN :solução aquosa de NH_4OH 0,01% (pH 8,4) (35:65, v/v); vazão: 0,7 mL min^{-1} . Pesticidas (concentração de 2 mg L^{-1}): (1) benomil, (2) tebutiuron, (3) simazina, (4) atrazina, (5) diuron, (6) ametrina

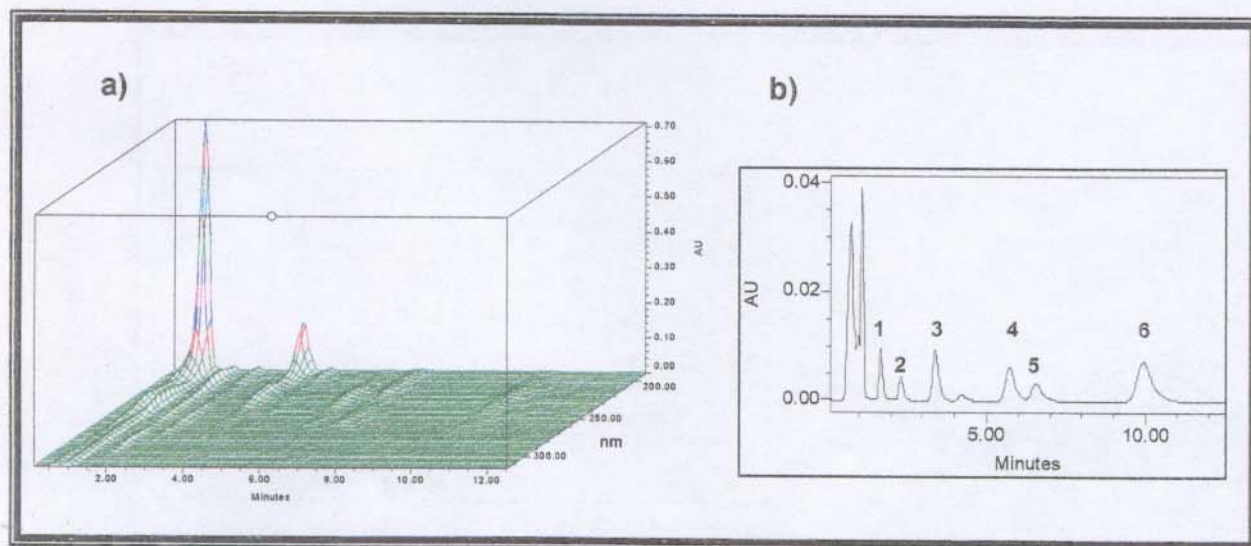


Figura 37: Cromatogramas referentes ao estudo de calibração na matriz. **a)** detecção por arranjo de diodos (190-320 nm); **b)** detecção em 235 nm; matriz: tomate; cartucho octadecil comercial. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; coluna Purospher RP-18 125 x 3 mm, com coluna de guarda; fase móvel CH_3CN :solução aquosa de NH_4OH 0,01% (pH 8,4) (35:65, v/v); vazão: 0,7 mL min^{-1} . Pesticidas (concentração de 2 mg L^{-1}): (1) benomil, (2) tebutiuron, (3) simazina, (4) atrazina, (5) diuron, (6) ametrina

A tabela 26 mostra os parâmetros das curvas analíticas obtidas via calibração na matriz. A comparação com os resultados da tabela 18, referente à calibração convencional (calibração no solvente), mostra que a principal diferença é com relação aos coeficientes angulares (b) das curvas. Os valores indicam que a sensibilidade conseguida com a calibração na matriz é menor do que na calibração no solvente, para todos os casos estudados, porém, assim como na calibração no solvente, diuron e ametrina continuam apresentando os maiores valores de sensibilidade.

Tabela 26: Parâmetros da curva analítica, obtidos via calibração na matriz

Matriz: uva – cartucho aminopropil			
Pesticida	a (intercepto)	b (inclinação)	r
Benomil	2148,42	12,232	0,99878
Tebutiuron	1624,50	11,950	0,99970
Simazina	581,460	10,715	0,99164
Atrazina	2773,78	9,3820	0,99444
Diuron	-709,320	24,640	0,99860
Ametrina	5347,26	27,234	0,99901
Matriz: tomate – cartucho aminopropil			
Pesticida	a (intercepto)	b (inclinação)	r
Benomil	1697,72	11,538	0,99948
Tebutiuron	855,250	11,418	0,99994
Simazina	4702,34	7,4630	0,99304
Atrazina	-427,880	10,416	0,99997
Diuron	1990,97	21,833	0,99971
Ametrina	1491,52	27,144	0,99779
Matriz: uva – cartucho octadecil			
Pesticida	a (intercepto)	b (inclinação)	r
Benomil	1882,87	9,9290	0,99732
Tebutiuron	677,790	9,9990	0,99472
Simazina	-824,540	7,9980	0,99717
Atrazina	-3158,94	10,419	0,98973
Diuron	-1411,13	19,477	0,99750
Ametrina	-1224,49	25,008	0,99923
Matriz: tomate – cartucho octadecil			
Pesticida	a (intercepto)	b (inclinação)	r
Benomil	-145,210	9,7840	0,99920
Tebutiuron	-269,270	9,8680	0,99997
Simazina	-352,140	6,9510	0,99936
Atrazina	-1512,28	8,9730	0,99977
Diuron	-1358,94	18,690	0,99844
Ametrina	-4200,79	23,018	0,99489

$y = a + bx$; a = coeficiente linear; b = coeficiente angular; r = coeficiente de correlação

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados (tabela 27) da mesma forma como foram calculados na calibração no solvente, descrita no item "Limites de Detecção (LOD) e Limites de Quantificação (LOQ)", do capítulo 4 (pag. 75).

Nota-se que a calibração na matriz gera um aumento dos LOQ do método para todos os pesticidas. Os métodos para herbicidas passam a ter LOQ maiores que os MRL estabelecidos (tabela 20), porém para o fungicida benomil continua com LOQ abaixo dos MRL, em cartuchos aminopropil e octadecil, tanto para uva como para tomate.

Tabela 27: Limites de detecção e quantificação (expressos em $\mu\text{g kg}^{-1}$) obtidos via calibração na matriz, utilizando cartuchos comerciais

Matriz: uva – cartucho aminopropil		
Pesticida	LOD	LOQ
Benomil	96,2	292
Tebutiuron	47,2	144
Simazina	253	766
Atrazina	206	625
Diuron	103	311
Ametrina	86,2	261
Matriz: tomate – cartucho aminopropil		
Pesticida	LOD	LOQ
Benomil	62,2	188
Tebutiuron	20,9	63,2
Simazina	366	1110
Atrazina	14,3	43,4
Diuron	46,5	141
Ametrina	128	388
Matriz: uva – cartucho octadecil		
Pesticida	LOD	LOQ
Benomil	141	427
Tebutiuron	198	601
Simazina	145	439
Atrazina	278	842
Diuron	219	663
Ametrina	75,4	228
Matriz: tomate – cartucho octadecil		
Pesticida	LOD	LOQ
Benomil	77,2	234
Tebutiuron	16,0	48,4
Simazina	68,7	208
Atrazina	41,7	126
Diuron	107	325
Ametrina	195	592

Estas mudanças nos parâmetros de calibração e nos limites de detecção e de quantificação, observadas com a calibração na matriz, acontecem devido a uma supressão na resposta do analito causada pelos componentes presentes na matriz.

O estudo realizado aqui teve o intuito de demonstrar como os constituintes da matriz podem exercer influência sobre os resultados. A maioria das análises em frutas e vegetais realizadas para controle de qualidade ou inspeção fitossanitária utilizam a calibração no solvente.

A calibração na matriz é uma técnica recentemente pesquisada e que vem demonstrando que a calibração pode causar distorções nas análises. Os mais recentes estudos envolvendo calibração na matriz [72,150] buscam estabelecer procedimentos simples para introduzir essa prática nas rotinas analíticas ou servir como instrumento para estabelecer modelos matemáticos que corrijam as distorções causadas ao se empregar a calibração no solvente.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que foram desenvolvidos novos materiais para extração em fase sólida, devidamente caracterizados, que foram submetidos à análise multirresíduo de pesticidas de diferentes classes em uvas e tomates. As metodologias analíticas foram validadas e apresentaram resultados satisfatórios, dentro de limites aceitos internacionalmente.

As fases sólidas desenvolvidas foram caracterizadas (tabelas 10 a 12 e figuras 7 a 10). Os valores de porcentagem de carbono obtidos para os materiais aminopropil com 10% de polímero e octadecil (tabela 10) foram muito semelhantes aos valores dos materiais similares comercializados. Os espectros de infravermelho (figuras 7, 8 e 9) mostraram claramente que houve alteração na superfície da sílica, com a incorporação de material polimérico. As análises termogravimétricas (figura 10 e tabela 11) mostraram que os materiais preparados são mais estáveis termicamente na faixa de trabalho de 25 a 200 °C do que os materiais comerciais. A análise de área superficial (tabela 12) específica mostrou que os materiais *lab-made* têm maior área superficial do que os comerciais e esta característica é desejável em SPE.

As fases sólidas aminopropil preparadas com 40% de polímero apresentaram um teor de carbono maior que o material comercial, fato esse que pode ter contribuído para o bom desempenho deste material na análise de pesticidas em uvas e tomates (tabelas 21 a 24 e figuras 18 a 26). Os materiais C18 não apresentaram o mesmo comportamento para análise multirresíduo, porém foram adequados na análise individual de pesticidas apolares, como diuron e ametrina.

A preparação de materiais a partir da imobilização de polissiloxano aminofuncionalizado sobre a superfície de sílica foi testada pela primeira vez neste trabalho. A obtenção de materiais para extração em fases sólida, a partir deste processo, apresenta uma série de vantagens, sob vários aspectos:

- **Simplicidade:** O procedimento proposto é uma maneira extremamente simples de se obterem materiais para uso em cartuchos de extração em fase sólida; a preparação do material é realizada à temperatura ambiente, envolvendo reagentes pouco tóxicos e equipamentos simples.
- **Disponibilidade dos reagentes:** Os materiais necessários, tais como a sílica gel, os polissiloxanos e demais solventes são disponíveis comercialmente.
- **Preparação envolvendo menor número de etapas:** As características apresentadas pelos materiais dispensam a etapa de capeamento, diminuindo assim o custo e o

tempo de preparação.

- **Menor custo:** O custo dos materiais é menor quando comparado aos comerciais; uma estimativa indica que os materiais preparados têm um custo de produção aproximadamente 40% menor do que o preço de mercado dos produtos similares.
- **Desempenho satisfatório:** Os materiais foram testados em análises de pesticidas pertencentes a diferentes classes (e, portanto, de características físico-química muito diferentes), em amostras complexas, e apresentaram resultados satisfatórios de recuperação.
- **Vasto campo de aplicação:** O uso da extração em fase sólida se encontra em franco desenvolvimento, sendo uma técnica aplicada na análise de diversos tipos de matrizes complexas, tais como alimentos, fluidos biológicos, amostras ambientais, águas e solos. Entretanto, todos os cartuchos de extração em fase sólida disponíveis comercialmente são importados e deste modo o tempo entre a compra e a entrega pode ser longo, caso as empresas não os tenham em estoque. Com o método proposto, os cartuchos podem ser confeccionados rapidamente e, se for necessário, em grandes quantidades. Ou seja, o fator 'tempo' perde importância, já que as fases podem ser produzidas a qualquer instante.
- **Confeção de colunas para extração on-line:** Além da aplicação do material em extração no modo *off-line*, é possível utilizar esta mesma fase sólida para recheir pequenas colunas (denominadas colunas de enriquecimento de traços) para uso em extrações *on-line*.

Com relação às metodologias desenvolvidas, estas foram adaptadas de métodos já existentes, com redução nas quantidades de amostras e solventes consumidos. O método de de Kok e Hiemstra [64], para cartuchos aminopropil, utiliza 15 g de amostra e 90 mL de solvente nas etapas de extração e partição líquido-líquido. A adaptação estabelecida reduziu para 5 g a quantidade de amostra e para 21 mL o volume de solventes, sendo que a maioria dos métodos para análise de pesticidas em frutas e vegetais trabalha com quantidades de amostra que vão de 15 a 50 g. Além disso, deve-se destacar que o método com cartuchos aminopropil foram adaptados para um ambiente multiclasse e utilizando um único comprimento de onda para detecção.

Devido à complexidade das amostras, os métodos estabelecidos exigiram várias

etapas de preparação, incluindo extração, partição líquido-líquido e extração em fase sólida antes da etapa cromatográfica propriamente.

As limitações do equipamento comprometeram o estabelecimento de limites de detecção e de quantificação mais baixos, porém os LOD e LOQ estabelecidos (tabela 19) ficaram abaixo dos limites máximos de resíduos de pesticidas relatados para as amostras estudadas (tabela 20).

Foram validadas metodologias envolvendo dois modos de SPE (*clean-up* e pré-concentração), empregando materiais comerciais e desenvolvidos (tabelas 21 a 24 e figuras 18 a 26).

A definição de condições cromatográficas envolvendo a detecção em um comprimento de onda único e comum a todos os pesticidas em estudo faz com que o método estabelecido seja praticamente inédito na literatura, pois envolve a análise multirresíduo e multiclasse através de cromatografia líquida com detecção em comprimento de onda fixo. Geralmente as metodologias de análise multiclasse de pesticidas utilizam detector por arranjo de diodos ou espectrômetro de massas.

A análise de uvas e tomates do varejo através das melhores metodologias desenvolvidas (figuras 27 a 32) não detectou a presença dos pesticidas estudados na maioria dos casos. Em algumas amostras (figuras 29 e 32), o aparecimento de um pico com máximo de absorvância em 220 nm sugere a presença de triazina, porém a confirmação da identidade do pico poderia ser realizada com maior segurança através de um detector de espectrometria de massas, não disponível para este trabalho.

Os estudos com calibração na matriz (figuras 34 a 37 e tabelas 26 a 27) mostraram LOD e LOQ mais altos do que os obtidos com a calibração convencional, porém ainda abaixo dos valores de MRL para o benomil. Os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas através de calibração na matriz (tabela 26) indicaram menor sensibilidade (coeficientes angulares menores que os obtidos na calibração convencional). O estudo de calibração na matriz, apesar de resumido, indicou que este aspecto é importante, podendo causar distorções nos resultados. Deve ser levado em conta e estudado em maior profundidade, tendo como objetivo incorporar as variações geradas pelo efeito da matriz nos resultados de análise de rotina.

Direcionamentos Futuros

Como foi dito na exposição dos objetivos deste trabalho, ele tem aspectos de continuidade e de inovação. O aspecto inovador envolve a proposta de uma nova tecnologia para produção de materiais para SPE.

Acreditamos que, neste trabalho, contribuímos para o estabelecimento de um procedimento para a obtenção de novos materiais para SPE e no estabelecimento de metodologias que permitem a análise multirresíduo de pesticidas em uvas e tomates empregando estes materiais desenvolvidos.

Acreditamos que a continuidade desta linha de pesquisa caminha no sentido de:

- i) testar os materiais desenvolvidos em outras matrizes e com outros pesticidas;
- ii) testar os materiais desenvolvidos em outros formatos de dispositivos de extração, como colunas de extração *on-line* e sistemas MSPD (Dispersão da Matriz em fase Sólida);
- iii) ampliar os estudos sobre calibração na matriz, com o objetivo em estabelecê-la como a forma principal de se realizar a calibração do método;
- iv) ampliar a etapa de validação das metodologias, incorporando aspectos de validação interlaboratorial.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Brasileiro de Frutas (IBRAF) – <http://www.ibraf.org.br>, acesso em setembro/2002.
2. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, *Agricultura em Números – 2001*, <http://www.agricultura.gov.br>, acesso em agosto/2002.
3. Associação dos Produtores de Hortigranjeiros e Derivados do Vale do São Francisco (VALEXPORT), <http://www.valexport.com.br>, acesso em agosto/2002.
4. Decreto Nº 4074, de 4 de janeiro de 2002, publicado no Diário Oficial de 08/01/2002.
5. C. Bolognesi, G. Morasso, "Genotoxicity of Pesticides: Potential Risk for Consumers", *Trends Food Sci. Tech.*, 11 (2000) 182.
6. M. Younes, H. Galal-Gorchev, "Pesticides in Drinking Water - A Case Study", *Food Chem. Toxicol.*, 38 (2000) S87.
7. F.A.D. Zambrone, "Perigosa Família", *Ciência Hoje*, 4 (1986) 44.
8. C.M.P. Vaz, S. Crestana, S.A.S. Machado, L.H. Mazo, M.R.C. Massaropi, L.A. Avaca, "Determinação de Pesticidas por Técnicas Eletroanalíticas", *Pesticidas, Rev. Tec. Cient.*, 6 (1996) 55.
9. S. Hatrik, J. Tekel, "Extraction Methodology and Chromatography for the Determination of Residual Pesticides in Water", *J. Chromatogr. A*, 733 (1996) 217.
10. M.L. Richardson, editor in "The Dictionary of Substances and their Effects", Royal Society of Chemistry, Chippenham, 1992.
11. F. Hernández, C. Hidalgo, J.V. Sancho, F.J. López, "New Method for the Rapid Determination of Triazine Herbicides and Some of Their Main Metabolites in Water by Using Coupled-Column Liquid Chromatography and Large Volume Injection", *J. Chromatogr. A*, 788 (1997) 171.
12. Pesticide Information Profiles (PIFs) of Extension Toxicology Network (EXTOXNET), <http://ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/ghindex.html>, acesso em 18/nov/1998.
13. J.V. Sancho, C. Hidalgo, F. Hernández, "Direct Determination of Bromacil and Diuron Residues in Environmental Water Samples by Coupled-Column Liquid Chromatography and Large-Volume Injection", *J. Chromatogr. A*, 761 (1997) 322.
14. J.J.V. Oliveira, J.M.M. Sigrist, C.A. Spulverato, M. Pohlmann, "Degradação de Benomil em Mangas Palmer Tratadas Pós-Colheita", *Pesticidas, Rev. Ecotoxicol. Meio Ambiente*, 7 (1997) 25.
15. G.S. Nunes, M.L. Ribeiro, "Pesticidas: Uso, Legislação e Controle", *Pesticidas, Rev. Ecotoxicol. Meio Ambiente*, 9 (1999) 31.
16. Codex Alimentarius Commission, <http://www.codexalimentarius.net>, acesso em agosto/2002.
17. Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP), *Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos*, 1999.
18. I. Krull, M. Swartz, "The International Conference on Harmonization", *LC-GC N. Am.*, 17 (1999) 857.
19. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), correspondência pessoal, em 02/08/2002.

20. http://www.greenpeace.cl/html/toxicos/convenio_estocolmo.htm, acesso em 7/10/2002.
21. L.E.F. Apachitei, J.A. Hirst, M.A. Siebel, H.J. Gijzen, "Diuron Degradation by *Phanerochaete Chrysosporium* BKM-F-1767 in Synthetic and Natural Media", *Biotechnol. Lett.*, 21 (1999) 147.
22. A. Khadrani, F.S. Murandi, R. Steiman, T. Vroumsia, "Degradation of Three Phenylurea Herbicides (Chlortoluron, Isoproturon and Diuron) by Micromycetes Isolated from Soil" *Chemosphere*, 38 (1999) 3041.
23. J.E. Cullington, A. Walker, "Rapid Biodegradation of Diuron and Other Phenylurea Herbicides by a Soil Bacterium", *Soil Biol. Biochem.*, 31 (1999) 677.
24. S.C.N. Queiroz, "Determinação Multirresíduos de Pesticidas em Água por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Ênfase em Detecção por Espectrometria de Massas e Novos Sorventes para Extração em Fase Sólida", Tese de Doutorado, Unicamp, Campinas, 2001.
25. H.K. No, N.Y. Park, S.H. Lee, S.P. Meyers, "Antibacterial Activity of Chitosans and Chitosan Oligomers with Different Molecular Weights", *Int. J. Food Microbiol.*, 74 (2002) 65.
26. M.N.V.R. Kumar, "A Review of Chitin and Chitosan Applications", *React. Funct. Polym.*, 46 (2000) 1.
27. S. Roller, N. Covill, "The Antifungal Properties of Chitosan in Laboratory Media and Apple Juice", *Int. J. Food Microbiol.*, 47 (1999) 67.
28. <http://www.insite.com.br/bio/wfalmeida/biotec.htm>, acesso em 16/08/2002.
29. <http://router.ceap.g12.br/projetos/2aTransgenicos/inicial.htm>, acesso em 16/08/2002.
30. C.M. Tores, Y. Picó, J. Mañes, "Determination of Pesticides Residues in Fruits and Vegetables", *J. Chromatogr. A*, 754 (1996) 301.
31. C.H. Collins, G.L. Braga, P.S. Bonato (coord.), *Introdução a Métodos Cromatográficos*, 4ª edição, Editora da Unicamp, Campinas, 1990.
32. C.F. Poole, S.K. Poole, *Chromatography Today*, Elsevier Science Publishers, B.V., Amsterdam, 1991.
33. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, 2ª edição, Wiley Interscience, New York, 1997.
34. H.M. McNair, J.M. Miller, *Basic Gas Chromatography*, Wiley Interscience, New York, 1998.
35. S.L. Moraes, M.O.O. Rezende, L.E. Nakagawa, L.C. Luchini, "Análise de Resíduos de Pesticidas em Tomates por Cromatografia em Camada Delgada", *Quim. Nova*, 25 (2002) 196.
36. O. Núñez, E. Moyano, M.T. Galceran, "Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry for the Analysis of Quaternary Ammonium Herbicides", *J. Chromatogr. A*, 974 (2002) 243.
37. G.S. Nunes, I.A. Toscano, D. Barceló, "Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples by Enzyme-Linked Immunosorbent Assays", *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 17 (1998) 79.

38. A. Dankwardt, J. Müller, B. Hock, "Stabilization of Enzyme Immunoassays for Atrazine", *Anal. Chim. Acta*, 362 (1998) 35.
39. M.C. Hennion, D. Barceló, "Strengths and Limitations of Immunoassays for Effective and Efficient Use for Pesticide Analysis in Water Samples: A Review", *Anal. Chim. Acta*, 362 (1998) 3.
40. K.G. Das (ed.), *Pesticide Analysis*, Marcel Dekker Inc., New York, 1981.
41. S. Navickiene, M.L. Ribeiro, "Procedimento Simplificado de Extração para Análise de Resíduos de Carbendazim em Uva por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", *Pesticidas, Rev. Ecotoxicol. Meio Ambiente*, 10 (2000) 23.
42. S. Riediker, H. Obrist, N. Varga, R.H. Stadler, "Determination of Chlormequat and Mepiquat in Pear, Tomato, and Wheat Flour Using On-Line Solid-Phase Extraction (Prospekt) Coupled with Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 966 (2002) 15.
43. A. Abad, M.J. Moreno, R. Pelegrí, M.I. Martínez, A. Sáez, M. Gamón, A. Montoya, "Monoclonal Enzyme Immunoassay for the Analysis of Carbaryl in Fruits and Vegetables without Sample Cleanup" *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 1707.
44. H. Diserens, M. Henzelin, "Determination of Abamectin Residues in Fruits and Vegetables by High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, 833 (1999) 13.
45. M.D. Gil Garcia, J.L. Martínez, M.M. Galera, C. Rodríguez Torreblanca, C. Gonzalez, "Determination and Degradation of Methomyl in Tomatoes and Green Beans Grown in Greenhouses", *J. AOAC Int.*, 80 (1997) 633.
46. J. Garrido, M. Alba, I. Jimenez, E. Casado, M.L. Folgueiras, "Chromatographic Analysis of Imazalil and Carbendazim in Fruits: Method Validation and Residue Monitoring Program 1995", *J. Chromatogr. A*, 765 (1997) 91.
47. S.P.Q. Scalón, J.J.V. Oliveira, M.S. Abreu, A.B. Chitarra, "Resíduos de Benomil em Morangos Tratados Pré-Colheita (Solo) e Pós-Colheita (Imersão) e Armazenados a 4°C", *Pesticidas, Rev. Ecotoxicol. Meio Ambiente*, 7 (1997) 57.
48. J.L. Bernal, M.J. del Nozal, L. Toribio, J.J. Jiménez, J. Añena, "High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Benomyl and Carbendazim Residues in Apian Samples", *J. Chromatogr. A*, 787 (1997) 129.
49. N. Tharsis, J.L. Portillo, F. Broto-Puig, L. Comellas, "Simplified Reversed-Phase Conditions for the Determination of Benzimidazole Fungicides in Fruits by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection", *J. Chromatogr. A*, 778 (1997) 95.
50. A. di Muccio, I. Camoni, M. Ventriglia, D. Attard Barbini, M. Mauro, P. Pelosi, T. Generali, A. Ausili, S. Girolimetti, "Simplified Cleanup for the Determination of Benzimidazolic Fungicides by High-Performance Liquid-Chromatography with UV Detection", *J. Chromatogr. A*, 697 (1995) 145.
51. F. García-Sánchez, A. Aguilar-Gallardo, "Fluorimetric-Determination of the Fungicide Benomyl After Solvolysis", *Mikrochim. Acta*, 116 (1994) 211.
52. P.C. Bardalaye, W.B. Wheeler, "Simplified Method for the Cleanup and Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Benomyl in Mangoes", *J. Chromatogr.*, 330 (1985) 403.

53. H. Obana, M. Okihashi, K. Akutsu, Y. Kitagawa, S. Hori, "Determination of Acetamiprid, Imidacloprid, and Nitenpyram Residues in Vegetables and Fruits by High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection", *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 4464.
54. H.B. Christensen, K. Granby, "Method Validation for Strobilurin Fungicides in Cereals and Fruit", *Food Addit. Contam.*, 18 (2001) 866.
55. B.I.A. Kaipper, L.A.S. MaAdureira, H.X. Corseuil, "Use of Activated Charcoal in a Solid-Phase Extraction Technique for Analysis of Pesticide Residues in Tomatoes", *J. Braz. Chem. Soc.*, 12 (2001) 514.
56. G.E. Miliadis, N.G. Tsiropoulos, P.G. Aplada-Sarlis, "High-Performance Liquid Chromatography Determination of Benzoylurea Insecticides Residues in Grapes and Wine Using Liquid and Solid-Phase Extraction", *J. Chromatogr. A*, 835 (1999) 113.
57. A. de Kok, M. Hiemstra, "A Multiresidue Method for the Determination of Pesticide in Fruits and Vegetables Using Extraction and Multiple Chromatography – Detection Systems", *Poster apresentado no 2nd European Pesticide Residue Workshop*, Almeria, Espanha, 1998.
58. A. Sannino, "Determination of Phenylurea Herbicides Residues in Vegetables by Liquid Chromatography after Gel Permeation Chromatography and Florisil Cartridge Cleanup", *J. AOAC Int.*, 81 (1998) 1048.
59. G.S. Nunes, M.L. Ribeiro, L. Polese, D. Barceló, "Comparison of Different Clean-up Procedures for the Determination of N-Methylcarbamate Insecticides in Vegetable Matrices by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection", *J. Chromatogr. A*, 795 (1998) 43.
60. E. Minelli, A. Angioni, M. Melis, F.M. Pirisi, P. Cabras, "Determination of Carbamate Insecticides in Apple, Pears, and Lettuce by LC with UV Detector", *J. AOAC Int.*, 80 (1997) 1315.
61. H.S. Dórea, J.L. Tadeo, C. Sanchez-Brunete, "Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Fruits by Gas Chromatography with ITD and NPD Detection", *Chromatographia*, 43 (1996) 380.
62. J.F. Lawrence, C. Ménard, M.C. Hennion, V. Pichon, F. Le Goffic, N. Durand, "Use of Immunoaffinity Chromatography as a Simplified Cleanup Technique for the Liquid Chromatographic Determination of Phenylurea Herbicides in Plant Material", *J. Chromatogr. A*, 732 (1996) 277.
63. W. Dejonckheere, W. Steurbaut, S. Drieghe, R. Verstraeten, H. Braeckman, "Monitoring of Pesticide Residues in Fresh Vegetables, Fruits, and Other Selected Food Items in Belgium, 1991-1993", *J. AOAC Int.*, 79 (1996) 97.
64. M. Hiemstra, J.A. Joosten, A. de Kok, "Fully Automated Solid-Phase Extraction Cleanup and On-Line Liquid Chromatography Determination of Benzimidazole Fungicides in Fruits and Vegetables", *J. AOAC Int.*, 78 (1995) 1267.
65. A. de Kok, M. Hiemstra, "Optimization, Automation, and Validation of the Solid-Phase Extraction Cleanup and On-Line Liquid Chromatographic Determination of N-Methylcarbamate Pesticides in Fruits and Vegetables", *J. AOAC Int.*, 75 (1992) 1063.

66. V. Leoni, A.M. Caricchia, S. Chiavarini, "Multiresidue Method for Quantitation of Organophosphorus Pesticides in Vegetables and Animal Foods", *J. AOAC Int.*, 75 (1992) 511.
67. M.J. Page, M. French, "Determination of N-Methylcarbamates Insecticides in Vegetables, Fruits, and Feeds Using Solid-Phase Extraction Cleanup in the Normal Phase", *J. AOAC Int.*, 75 (1992) 1073.
68. S.M. Lee, M.L. Papathakis, H.M.C. Feng, G.F. Hunter, J.E. Carr, "Multipesticide Residue Method for Fruits and Vegetables: California Department of Food and Agriculture", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 339 (1991) 376.
69. F.H. Hernández, J.M. Grases, J. Beltrán, J.V. Sancho, "A Comparative Study of Different Multiresidue Methods for the Determination of Pesticides in Fruit Samples by Gas Chromatography", *Chromatographia*, 29 (1990) 459.
70. M. Navarro, Y. Picó, R. Marín, J. Mañes, "Application of Matrix Solid-Phase Dispersion to the Determination of a New Generation of Fungicides in Fruits and Vegetables", *J. Chromatogr. A*, 968 (2002) 201.
71. C.M. Torres, Y. Picó, J. Mañes, "Comparison of Octadecylsilica and Graphitized Carbon Black as Materials for Solid-Phase Extraction of Fungicide and Insecticide Residues from Fruits and Vegetables", *J. Chromatogr. A*, 778 (1997) 127.
72. F.J.E. González, M.E.H. Torres, E.A. López, L.C. Rodríguez, J.L.M. Vidal, "Matrix-Effects of Vegetable Commodities in Electron-Capture Detection Applied to Pesticide Multiresidue Analysis", *J. Chromatogr. A*, 966 (2002) 155.
73. J.L.M. Vidal, F.J. Arrebola, M.M. Sánchez, "Application of Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry to the Analysis of Pesticides in Fruits and Vegetables", *J. Chromatogr. A*, 959 (2002) 203.
74. A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, "Multiresidue Screening of Pesticides in Fruits Using an Automatic Solid-Phase Extraction System", *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 1109.
75. K. Adou, W.R. Bontoyan, P.J. Sweeney, "Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables by Accelerated Solvent Extraction and Capillary Gas Chromatography", *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 4153.
76. S. Navarro, A. Barba, G. Navarro, N. Vela, J. Oliva, "Multiresidue Method for the Rapid Determination – in Grape, Must and Wine – of Fungicides Frequently Used on Vineyards", *J. Chromatogr. A*, 882 (2000) 221.
77. P. Cabras, A. Angioni, "Pesticide Residues in Grapes, Wine and their Processing Products", *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 967.
78. G.J. Soleas, J. Yan, K. Hom, D.M. Goldberg, "Multiresidue Analysis of Seventeen Pesticides in Wine by Gas Chromatography with Mass-Selective Detection", *J. Chromatogr. A*, 882 (2000) 205.
79. T. Pihlström, B.G. Österdahl, "Analysis of Pesticide Residues in Fruit and Vegetables after Cleanup with Solid-Phase Extraction Using ENV+(Polystyrene-Divinylbenzene) Cartridges", *J. Agric. Food Chem.*, 47 (1999) 2549.
80. E. Lacassie, M.F. Dreyfuss, J.L. Daguet, M. Vignaud, P. Marquet, G. Lachâtre, "Multiresidue Determination of Pesticides in Apples and Pears by Gas Chromatography-Mass Spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 805 (1998) 319.

81. J. Hajšlova, K. Holadova, V. Kocourek, J. Poustka, M. Godula, P. Cuhra, M. Kempny, "Matrix-Induced Effects: a Critical Point in the Gas Chromatographic Analysis of Pesticide Residues", *J. Chromatogr. A*, 800 (1998) 283.
82. H.S. Dórea, M.A. Barbirato, F.M. Lanças, "Método Multirresíduo com Extração em Fase Sólida para Análise de Diazinon, Malation, Pirazofós e Permetrina em Limão "Tahiti" por Cromatografia à Gás de Alta Resolução com Detector de Captura de Elétrons (HRGC/ECD)", *Pesticidas, Rev. Ecotoxicol. Meio Ambiente*, 7 (1997) 109.
83. R.R. Roy, P. Wilson, R.R. Laski, J.I. Roberts, J.A. Weishaar, R.L. Bong, N.J. Yess, "Monitoring of Domestic and Imported Apples and Rice by the U.S. Food and Drug Administration Pesticide Program", *J. AOAC Int.*, 80 (1997) 883.
84. P. Parrilla, J.L.M. Vidal, "HPLC Determination of Pesticides in Green Bean Samples after SPE Clean-up", *Chromatographia*, 43 (1996) 265.
85. J. Fillion, R. Hindle, M. Lacroix, J. Selwyn, "Multiresidue Determination of Pesticides in Fruit and Vegetables by Gas Chromatography-Mass-Selective Detection and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection", *J. AOAC Int.*, 78 (1995) 1252.
86. Y. Nakamura, Y. Tonogai, Y. Sekiguchi, Y. Tsumura, N. Nishida, K. Takakura, M. Isechi, K. Yuasa, M. Nakamura, N. Kifune, K. Yamamoto, S. Terasawa, T. Oshima, M. Miyata, K. Kamakura, Y. Ito, "Multiresidue Analysis of 48 Pesticides in Agricultural Products by Capillary Gas Chromatography", *J. Agric. Food Chem.*, 42 (1994) 2508.
87. S. Lacorte, J.J. Vreuls, J.S. Salau, F. Ventura, D. Barceló, "Monitoring of Pesticides in River Water Using Fully Automated On-Line Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with Diode Array Detection with a Novel Filtration Device", *J. Chromatogr. A*, 795 (1998) 71.
88. E. Mallat, D. Barceló, R. Tauler, "Degradation Study of Benomyl and Carbendazim in Water by Liquid Chromatography and Multivariate Curve Resolution Methods", *Chromatographia*, 46 (1997) 342.
89. H. Itoh, S. Kawasaki, J. Tadano, "Application of Liquid Chromatography Atmospheric-Pressure Chemical-Ionization Mass Spectrometry to Pesticide Analysis", *J. Chromatogr. A*, 754 (1996) 61.
90. C. Blasco, Y. Picó, G. Font, "Monitoring of Five Postharvest Fungicides in Fruit and Vegetables by Matrix Solid-Phase Dispersion and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry", *J. AOAC Int.*, 85 (2002) 704.
91. D. Perret, A. Gentili, S. Marchese, M. Sergi, G. D'Ascenzo, "Validation of a Method for the Determination of Multiclass Pesticide Residues in Fruit Juices by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry after Extraction by Matrix Solid-Phase Dispersion", *J. AOAC Int.*, 85 (2002) 724.
92. P.L. Buldini, L. Ricci, J.L. Sharma, "Recent Applications of Sample Preparation Techniques in Food Analysis", *J. Chromatogr. A*, 975 (2002) 47.
93. C. Blasco, G. Font, Y. Picó, "Comparison of Microextraction Procedures to Determine Pesticides in Oranges by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 970 (2002) 201.

94. United States Food and Drug Administration (US-FDA), *Pesticide Analytical Manual (PAM)*, 3rd ed., 1994 (revisado em outubro/1999).
95. S.C.N. Queiroz, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, "Métodos de Extração e/ou Concentração de Compostos Encontrados em Fluidos Biológicos para Posterior Determinação Cromatográfica", *Quim. Nova*, 24 (2001) 68.
96. G. LeBlanc, "A Review of EPA Sample Preparation Techniques for Organic Compound Analysis of Liquid and Solid Samples", *LC-GC N. Am.*, 19 (2001) 1120.
97. M.C. Hennion, "Solid-Phase Extraction: Method Development, Sorbents, and Coupling with Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, 856 (1999) 3.
98. C.F. Poole, S.K. Poole, D.S. Seibert, C.M. Chapman, "Determination of Kinetic and Retention Properties of Cartridge and Disk Devices for Solid-Phase Extraction", *J. Chromatogr. B*, 689 (1997) 245.
99. D.D. Blevins, D.O. Hall, "Recent Advances in Disk-Format Solid-Phase Extraction", *LCGC suppl.*, (Maio 1998) 16.
100. A.L. Lopes, A.L.P. Valente, F. Augusto, "Microextração em Fase Sólida", *Rev. Analytica*, 1 (2002) 25.
101. C.L. Arthur, J. Pawliszyn, "Solid-Phase Microextraction with Thermal-Desorption Using Fused-Silica Optical Fibers", *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2145.
102. M. Fernández, Y. Picó, J. Mañes, "Determination of Carbamate Residues in Fruits and Vegetables by Matrix Solid-Phase Dispersion and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 871 (2000) 43.
103. H.S. Dórea, "Análise Multirresíduo de Pesticidas Organofosforados e Piretróides em Frutas por CGC, após Extração com Fluido Supercrítico. Comparação com LLE, SPE, MSPD", Tese de Doutorado, USP, São Carlos, 1999.
104. E. Tonhi, K.E. Collins, I.C.S.F. Jardim, C.H. Collins, "Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) Baseadas em Superfícies de Óxidos Inorgânicos Funcionalizados", *Quim. Nova*, 25, (2002), 616.
105. E. Tonhi, S. Bachmann, K. Albert, I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, C.H. Collins, "High-Performance Liquid Chromatography Stationary Phases Based on Poly(methyloctylsiloxane) Immobilized on Silica I. Physcal and Chemical Characterizations", *J. Chromatogr. A*, 948 (2002) 97.
106. E. Tonhi, K.E. Collins, C.H. Collins, "High-Performance Liquid Chromatography Stationary Phases Based on Poly(methyloctylsiloxane) Immobilized on Silica II. Chromatographic Evaluation", *J. Chromatogr. A*, 948 (2002) 109.
107. G.M.F. Pinto, K.E. Collins, I.C.S.F. Jardim, "C-18 Stationary Phases Sorbed on Zirconized Silica for Use in HPLC", *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 25 (2002) 205.
108. S. Bachmann, L.F.C. Melo, R.B. Silva, T.A. Anazawa, I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, C.H. Collins, K. Albert, "Synthesis and Solid-State NMR Investigation of Radiation-Immobilized Polysiloxanes on Bare, Titanium-Grafted, and Zirconium-Grafted Silicas", *Chem. Mater.*, 13 (2001) 1874.

109. R.B. Silva, Y. Gushikem, C.H. Collins, "Synthesis, Characterization, and Chromatographic Evaluation of Titanium Tetrabutoxide-Modified Silica as a Support for HPLC-RP Separations in Alkaline Mobile Phases", *J. Sep. Sci.*, 24 (2001) 49.
110. L.F.C. Melo, C.H. Collins, K.E. Collins, I.C.S.F. Jardim, "Stability of HPLC Columns Packed with Poly(methyloctylsiloxane) Sorbed and Radiation-Immobilized onto Porous Silica and Zirconized Silica", *J. Chromatogr. A*, 869 (2000) 129.
111. L.F.C. Melo, I.C.S.F. Jardim, "Development of C8 Stationary Phases, Immobilized by Gamma Radiation on Zirconized Silica, for High-Performance Liquid Chromatography Applications", *J. Chromatogr. A*, 845 (1999) 423.
112. R.B. Silva, K.E. Collins, C.H. Collins, "Effects in High-Performance Liquid Chromatography of a High pH in the Mobile Phase on Poly(methyloctylsiloxane) Immobilized by Gamma-Radiation on Titanium-Grafted Silica", *J. Chromatogr. A*, 869 (2000) 137.
113. I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, T.A. Anazawa, "Radiation Immobilization of Poly(methyloctylsiloxane) on Silica for Use in HPLC: a Uniform Layer Model", *J. Chromatogr. A*, 849 (1999) 299.
114. R.B. Silva, C.H. Collins, "Chromatographic Evaluation of Radiation-Immobilized Poly(methyloctylsiloxane) on Titanium-Grafted Silica", *J. Chromatogr. A*, 845 (1999) 417.
115. M.C.H. da Silva, I.C.S.F. Jardim, "Preparation of a C-18 Stationary Phase Immobilized by Gamma Radiation for Use in High Performance Liquid Chromatography", *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 21 (1998) 2447.
116. T.A. Anazawa, I.C.S.F. Jardim, "The Chromatographic Behavior of Coated Stationary Phases with Different Silicas", *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 21 (1998) 645.
117. K.E. Collins, M.L.M.M. Granja, R.G. Pereira Filho, T.A. Anazawa, I.C.S.F. Jardim, "The Spatial Distribution of Poly(methyloctylsiloxane) Deposited by Solvent Evaporation in the Pores of HPLC Silica Particles", *Chromatographia*, 45 (1997) 99.
118. T.A. Anazawa, F. Carraro, K.E. Collins, I.C.S.F. Jardim, "Stability of High-Performance Liquid-Chromatography Columns Packed with C-1 and C-8 Polysiloxanes Sorbed into Porous Silica Particles", *J. Chromatogr. A*, 697 (1995) 159.
119. I.C.S.F. Jardim, T.A. Anazawa, "Polymethyloctylsiloxane Adsorbed on Porous Silica as a Packing Material for Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography", *J. Liq. Chromatogr.*, 17 (1994) 1265.
120. I.C.S.F. Jardim, L.F.C. Melo, S.C.N. Queiroz, *Processo de Confecção de Cartucho Tipo C18 Obtido via Tratamento Térmico para Uso em Extração em Fase Sólida (SPE)*, Pedido de patente depositado junto ao INPI em 09/Fev/2001, Nº PI0100578-2.
121. J.M. Pozzebon, S.C.N. Queiroz, L.F.C. Melo, M.A. Kapor, I.C.S.F. Jardim, "Application of New High-Performance Liquid Chromatography and Solid-Phase Extraction Materials to the Analysis of Pesticides in Human Urine", *J. Chromatogr. A*, 987 (2003) 381.

122. S.C.N. Queiroz, L.F.C. Melo, I.C.S.F. Jardim, "Poly(methyloctadecylsiloxane) Immobilized on Silica by Gamma Radiation for Use in Solid-Phase Extraction", *J. Chromatogr. A*, 948 (2002) 171.
123. H.F. Maltez, E. Carasek, L.F.C. Melo, I.C.S.F. Jardim, S.C.N. Queiroz, "Comparação da Eficiência de Colunas C18 Comerciais e Home-Made na Pré-Concentração de Complexos Metálicos de O,O-dietil-ditiofosfato", Poster apresentado na 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, Brasil, 2002, QA-105.
124. Codex Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling, *Criteria for evaluating acceptable methods of analysis for Codex purposes*, CX/MAS 95/3, 1995.
125. International Conference on Harmonisation (ICH), *Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology*, Q2A (CPMP/ICH/381/95), 1995.
126. International Conference on Harmonisation (ICH), *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.
127. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *Crítérios para Habilitação de Laboratórios Segundo os Princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL)*, GGLAS 02/BPL, 2001.
128. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *Resolução REC nº475*, de 19/03/2002.
129. United States Food and Drug Administration (US-FDA), *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, 2001.
130. United States Food and Drug Administration (US-FDA), *Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation*, 2000.
131. United States Food and Drug Administration (US-FDA), *Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods*, 1994.
132. European Union, *Quality Control Procedures for Pesticide Residue Analysis*, 2nd ed., 1999/2000.
133. European Commission, *Guidance Document on Residue Analytical Methods*, SANCO/825/00 rev. 6, 2000.
134. Eurachem Working Group, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 1998.
135. Ministry of Public Health, Netherlands, *Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs*, 1996.
136. R. Brown, M. Caphart, P. Faustino, R. Frankewich, J. Gibbs, E. Leutzing, G. Lunn, L. Ng, R. Rajagopalan, Y. Chiu, E. Sheinin, "Analytical Procedures and Method Validation: Highlights of the FDA's Draft Guidance", *LC-GC N. Am.*, 19 (2001) 74.
137. L.M.V. Soares, "Como Obter Resultados Confiáveis em Cromatografia", *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 60 (2001) 79.
138. A.R.C. Hill, S.L. Reynolds, "Guidelines for In-House Validation of Analytical Methods for Pesticide Residues in Food and Animal Feeds", *Analyst*, 124 (1999) 953.

139. I. Krull, M. Swartz, "Determining Limits of Detection and Quantitation", *LCGC*, 16 (1998) 922.
140. P. Bruce, P. Minkinen, M.L. Riekkola, "Practical Method Validation: Validation Sufficient for an Analysis Method", *Mikrochim. Acta*, 128 (1998) 93.
141. D.R. Jenke, "Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. Part I. General Concepts and Guidelines", *Instr. Sci. Technol.*, 25 (1997) 345.
142. D.R. Jenke, "Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. Part II. Guidelines for Primary Validation Parameters", *Instr. Sci. Technol.*, 26 (1998) 1.
143. D.R. Jenke, "Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. Part III. Ruggedness, Re-Validation, and System Suitability", *Instr. Sci. Technol.*, 26 (1998) 19.
144. M.E. Swartz, I.S. Krull, "Validação de Métodos Cromatográfico", *Pharm. Technol.*, Jun (1998) 12.
145. J.M. Green, "A Practical Guide to Analytical Method Validation", *Anal. Chem.*, 68 (1996) A305.
146. F. Augusto, J.C. Andrade, R. Custódio, "Faixa Linear de uma Curva de Calibração", site Chemkeys, <http://www.chemkeys.com>, acesso em outubro/2002.
147. L.S. Ettre, "Nomenclature for Chromatography", *Pure & Appl. Chem.*, 65 (1993) 852.
148. P.D. Johnson, D.A. Rimmer, R.H. Brown, "Adaptation and Application of a Multi-Residue Method for the Determination of a Range of Pesticides, Including Phenoxy Acid Herbicides in Vegetation, Used on High-Resolution Gel Permeation Chromatographic Clean-Up and Gas Chromatographic Analysis with Mass-Selective Detection", *J. Chromatogr. A*, 765 (1997) 3.
149. M. Hiemstra, A. de Kok, "Determination of Propamocarb in Vegetables Using Polymer-Based High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Mass-Spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 972 (2002) 231.
150. J. Zrostlíková, J. Hajslová, J. Poustka, P. Begany, "Alternative Calibration Approaches to Compensate the Effect of Co-Extracted Matrix Components in Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation Mass Spectrometry Analysis of Pesticide Residues in Plant Materials", *J. Chromatogr. A*, 973 (2002) 13.
151. G.M.F. Pinto, I.C.S.F. Jardim, "Use of Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Triazine Residues in Water: Validation of the Method", *J. Chromatogr. A*, 869 (2000) 463.
152. J.M. Pozzebon, "Desenvolvimento de Métodos de Extração, Separação e Quantificação de Herbicidas em Fluido Biológico", Tese de Doutorado, Unicamp, Campinas, 2002.
153. G.M.F. Pinto, "Desenvolvimento de Metodologias para Determinação de Multirresíduos de Herbicidas e seus Metabólitos em Água e em Solo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Tese de Doutorado, Unicamp, Campinas, 2002.

154. J.M. Pozzebon, S.C.N. Queiroz, I.C.S.F. Jardim, "Development of Solid-Phase Extraction for Triazines: Application to a Biological Sample", *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 26 (2003) 767.
155. J.M. Pozzebon, W. Vilegas, I.C.S.F. Jardim, "Determination of Herbicides and a Metabolite in Human Urine by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry", *J. Chromatogr. A.*, 987 (2003) 375.
156. United Chemical Technologies, catálogo de produtos, <http://www.unitedchem.com>, acesso em agosto/2002.
157. C.B.G. Bottoli, "Sorção, Imobilização e Extração de Polissiloxanos em Sílicas Porosas para Uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Tese de Doutorado, Unicamp, Campinas, 2002.
158. United States Department of Agriculture (USDA), *USDA Nutrient Database for Standard Reference*, http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/nut_search.pl, acesso em agosto/2002.
159. Codex Alimentarius Commission, codex <http://www.codexalimentarius.net> (<http://apps.fao.org/page/collections?subset=FoodQuality>), acesso em janeiro-2003.
160. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), <http://www.anvisa.gov.br> (<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/mono/index.htm>), acesso em janeiro-2003.
161. Environmental Protection Agency (US-EPA), <http://www.epa.gov/pesticides/food/viewtols.htm>, acesso em maio/2002.
162. The European Commission, http://europa.eu.int/comm/food/fs/ph_ps/pest/index_en.htm, acesso em janeiro/2003.
163. Supelco Guide for SPE ("Guide to Solid Phase Extraction"; Supelco; Sigma-Aldrich Co.; 1999.

*"(...) mas o que se aprende,
mais, é só a fazer outras
maiores perguntas."*

(João Guimarães Rosa)

ANEXOS



Application of new high-performance liquid chromatography and solid-phase extraction materials to the analysis of pesticides in human urine

Joseane M. Pozzebon^a, Sonia C.N. Queiroz^b, Lúcio F.C. Melo^a, Marcos A. Kapor^a,
Isabel C.S.F. Jardim^{a,*}

^aDepartment of Analytical Chemistry, Chemistry Institute, State University of Campinas, P.O. Box 6154, 13084-971,
Campinas, SP, Brazil

^bEmbrapa Environment, P.O. Box 69, 13820-000, Jaguariúna, SP, Brazil

Abstract

A method for the simultaneous determination of diuron and linuron pesticides in human urine was developed, using both solid-phase extraction (SPE) and high-performance liquid chromatography (HPLC) phases made in our own laboratory. These materials were prepared by sorption of polysiloxanes onto a silica surface, followed by immobilization. The HPLC columns were prepared from poly(methyloctylsiloxane), PMOS, immobilized onto silica with microwave radiation while the SPE cartridges were made with poly(methyloctadecylsiloxane), immobilized thermally. Method validation was performed for diuron and linuron for three fortification levels. The recoveries obtained were 85–103%, the inter- and intra-assay precisions were less than 1.6 and 1.8%, respectively. The limits of quantitation and detection for diuron were 2.4 and 8.0 µg/l and for linuron were 5.0 and 12 µg/l, respectively.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Stationary phases, LC; Sorbents; Pesticides; Siloxanes

1. Introduction

Exposure to pesticides is a concern of the general population, especially for residents in contaminated sites. Public health officials are frequently asked to evaluate an individual's risk of developing health problems from possible exposure to pesticides in the environment. Although most people are not occupationally exposed to pesticides, nearly everyone has some level of exposure resulting from food, air, water, or dermal contact [1,2]. Thus, fast, easy,

effective and validated methods for determination of pesticides in biological fluids are more necessary each year to monitor pesticides in the human body.

Urine, a very complex and multicomponent mixture, is one of the biological fluids of most interest. Large numbers of compounds ingested or formed in the body by metabolism are excreted in urine. Several classes of pesticides are metabolized or degraded to ureas or anilines [3–5]. The analysis of ureas in urine can thus provide an index of exposure to many of the pesticides in the environment.

Selective isolation of the analytes from the samples using a preconcentration procedure is often necessary prior to separation and measurement [6]. Many methods described in the literature for the

*Corresponding author. Tel.: +55-19-3788-3061; fax: +55-19-3788-3023.

E-mail address: icsfj@iqm.unicamp.br (I.C.S.F. Jardim).

determination of ureas and their metabolites (anilines) in urine require derivatization, silica gel clean-up and gas chromatography [5,7]. Recently, the use of high-performance liquid chromatography (HPLC) in this type of analysis has been developed, making possible the determination of new classes of pesticides. However, the use of solid-phase extraction (SPE) has not been reported in the literature for determination of neutral pesticides in urine by HPLC.

New materials for use as HPLC stationary phases and as SPE sorbents have been developed in recent years. These new materials consist of polysiloxanes sorbed and immobilized onto an appropriate silica support. This promising alternative method, instead of a chemical reaction, uses a wide variety of immobilization techniques and has been successfully applied to prepare several HPLC stationary phases, such as poly(methyloctylsiloxane) (PMOS) on zirconized silica [8,9], titanium-grafted silica [10] and pure silica [11–15]. A SPE sorbent based on poly(methyloctadecylsiloxane) (PMODS) immobilized by γ -radiation onto silica has also been described [16]. The main advantages of these procedures are good performance, lower cost, simplicity and reduction of toxic residues.

Another method for polymer immobilization is microwave radiation. This immobilization procedure has been used to prepare the stationary phase for HPLC columns, using PMOS and silica. Microwave radiation is a type of nonionizing energy that causes molecular movement from the phenomena of ionic migration and dipolar rotation [17–19]. The main advantage of the use of microwave irradiation is the high-speed heating, since it can accomplish a thermal immobilization more rapidly than oven heating. In addition, the cost and the precautions are minimized if compared with γ radiation and several other immobilization methods.

Validation is one of the most important steps in method development for analytical determinations. The main parameters involved are precision (intra- and inter-assay), recovery, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) and linearity [20].

This paper describes the validation of a method using SPE and HPLC for determination and quantification of the pesticides diuron and linuron (substituted ureas) in human urine. Both the HPLC and SPE

materials were prepared in our laboratory by immobilization of polysiloxanes onto a silica surface.

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

Diuron and linuron standards were obtained from DuPont and Hoescht, respectively. Stock solutions of each herbicide were prepared in methanol at concentrations of 100.9 $\mu\text{g/ml}$ (diuron) and 102.8 $\mu\text{g/ml}$ (linuron). The solutions used to construct the calibration curves and to spike the samples were prepared in mobile phase at a concentration of 2000 $\mu\text{g/l}$ for each herbicide and stored in the refrigerator at 4 °C.

The calibration curves involved eight different concentrations: 20, 40, 80, 160, 320, 600, 800 and 1000 $\mu\text{g/l}$ for diuron and 30, 60, 120, 240, 500, 800, 1200 and 1500 $\mu\text{g/l}$ for linuron. The injections were made in three replicates.

Acetonitrile and dichloromethane were Mallinckrodt chromatographic grade. Other reagents and solvents were analytical grade. Purified water was obtained from a Millipore Milli-Q Plus system. The following solvents were used in the preparation of the SPE sorbents: *n*-hexane (Mallinckrodt, HPLC-grade), methanol (Mallinckrodt, HPLC-grade) and *n*-pentane (Merck, analytical-reagent grade).

The silica for SPE was from Fluka, irregular particles, (0.040–0.063 mm, 200–400 mesh), pore size 10 nm and for the HPLC stationary phases it was from Phase Separations (Spherisorb 5 μm spherical particles, 8.0 nm pore size, 186 m^2/g specific surface area). PMODS and PMOS were from Petrarch Silanes and Silicones.

2.2. Equipment

The HPLC system consisted of a Rheodyne 7725i injector with a 10- μl loop, a Waters 510 pump and a Waters UV-Vis absorbance detector (Model 486). The data acquisition and treatment were performed by CHROMPERFECT software, version 3.03. The mobile phase (acetonitrile–water, 40:60, v/v) flow-rate was set at 0.8 ml/min and UV detection was at 254 nm.

All measurements were carried out at room temperature.

The urine samples were centrifuged in an Excelsa centrifuge, model MP, from Fanem (São Paulo, Brazil). The stationary phases were irradiated in a CCE M-34 microwave oven or heated in a ME27F model oven from Electrolux.

A model 51769 Haskel pump was used to pack the internally polished [21] HPLC columns.

2.3. Urine collection and storage

Urine samples (blanks) from human volunteers were collected and kept frozen at -20°C until use. After the urine samples had been thawed, they were shaken for homogenization. The required volume was then sampled as quickly as possible to avoid sedimentation of any solids.

2.4. Preparation of SPE cartridges

The silica support was dried at 120°C for 24 h. A sufficient quantity of support was added to a solution of PMODS dissolved in *n*-pentane to give a material with 40% (w/w) of PMODS. The mixture was stirred gently for 3 h at room temperature, after which the solvent was evaporated slowly at room temperature.

For thermal immobilization, an amount of the C_{18} loaded support was placed in a 120°C oven for 4 h, at atmospheric pressure. After immobilization the material was placed in a stainless steel tube. This tube was connected to a Waters 510 pump for extraction of all remaining soluble PMODS by passing approximately 25 ml of *n*-hexane per gram of sorbent, at a flow-rate of 2 ml/min. Then, 15 ml of methanol for each gram of material was passed through the tube, at a flow-rate of 3 ml/min. To make sure that all soluble residues were removed, an extra extraction step was made using a high-pressure packing pump (Haskel), at 1000 p.s.i. (6.9 MPa), in a proportion of 20 ml of methanol per gram of sorbent. After extraction, the solid-phase was removed from the tube and was kept at room temperature for 48 h for the solvent evaporation.

The cartridges were prepared using 0.5 g of

sorbent packed in a 5-ml polypropylene syringe. The material was retained by two polyethylene frits (20 μm pore size).

2.5. Preparation of the HPLC stationary phase

A sufficient quantity of silica was added to a solution of PMOS dissolved in dichloromethane to give a material with 40% (w/w) of PMOS. This mixture was stirred for 3 h before slow evaporation of the solvent at room temperature. The stationary phases were irradiated in a microwave oven at 495 W for 900 s and then extracted with chloroform and methanol at a pressure of 34.5 MPa to eliminate excess polymer. Columns were downward packed at 34.5 MPa in a Haskel pump using a 10% (w/v) slurry of the packing material in chloroform with methanol as propulsion solvent.

2.6. Sample preparation

A 2-ml volume of urine was fortified by addition of a predetermined volume of the 1000 $\mu\text{g/l}$ of solution containing the herbicides, resulting in three levels of fortification, 40, 80 and 160 $\mu\text{g/l}$ for diuron, and 60, 120 and 240 $\mu\text{g/l}$ for linuron. The sample was basified by addition of 200 μl of NH_4OH (pH~9) and diluted with 4 ml of acetonitrile. Deproteinization was carried out by centrifugation (5 min, 3000 g). A 3-ml aliquot of the supernatant containing urine-acetonitrile (1:2, v/v) was separated and diluted with 20 ml of Milli-Q water for the extraction procedure.

The sample was percolated through the SPE cartridges under vacuum at a flow-rate of 3 ml/min. Before sample application, the SPE cartridges were conditioned with 10 ml of methanol and equilibrated with 5 ml of Milli-Q water. After the sample had passed through the cartridge by vacuum, the cartridge was washed with 5 ml of Milli-Q water. This eluate was discarded and the sorbent bed was dried under vacuum for 3 min. The analytes were then eluted with 3 ml of dichloromethane. The solvent was evaporated to dryness under a stream of nitrogen and the residue was dissolved in 200 μl of acetonitrile. The injection volume was 10 μl .

2.7. Method validation

The LOD is the lowest pesticide concentration that can be detected but not necessarily quantified in a sample [22]. The LOD is expressed as a concentration in terms of signal-to-noise ratio (S/N). In this study LOD was calculated using three times the noise level.

The LOQ is the lowest pesticide concentration which can be determined or quantified in a sample with acceptable precision under the stated operational conditions of the method [23]. A S/N ratio of ten times the noise level was used to determine the LOQ.

After defining the analytical conditions, tests were made on the recovery of herbicides after SPE and HPLC. The recovery was measured as the response after processing a matrix matched standard, expressed as a percentage of the response of a pure standard which has not been subjected to sample pretreatment. It indicates whether the method provides a response for the entire amount of analyte that is present in the sample. It is best established by comparing the replicate responses of extracted samples at matrix concentrations with those of nonextracted standards which represent 100% recovery. The recovery was calculated [24] using the equation:

$$\text{Recovery} = \frac{\text{mass of analyte after extraction}}{\text{mass of analyte added}} \times 100$$

The linearity of a method is a measure of range within which the results are directly, or by a well defined mathematical transformation, proportional to

the concentration of analyte in a sample. For this analytical chromatographic technique, a linear relationship is observed between the detector response (y) and concentration (x) of the analyte in the samples in the form of linear calibration curve obtained by least-squares linear regression procedures [25] $y = a + bx$ where a is the intercept of the calibration curve and b is the slope.

The precision determines the analytical deviation, and is the most important criteria for evaluating analytical method performance. Precision reflects the variation in results when repetitive analysis are made on the same sample. The intra-assay precision was determined on the same day and consisted of three series and three replicates at each of three concentration levels. Inter-assay precision was calculated in three series and three replicates at one concentration on three different days.

The numerical value used was the relative standard deviation (RSD) of triplicate measurements of the analytes, using the equation:

$$\text{RSD} = 100 s/x_m$$

where $s = [\sum (x_i - x_m)^2 / n - 1]^{1/2}$, $x_m = \sum x_i / n$, n is the total number of measurements, and x_i is number of the individual measurements.

3. Results and discussion

3.1. SPE cartridges

Table 1 shows the results of characterization tests

Table 1
Characteristics of some commercially available C_{18} sorbents and the sorbents obtained by thermal immobilization of PMODS onto silica

Commercial name	Company	Type of bonding	% C	End-capped	Pore size (nm)	Particle size (μm)
Supelclean LC-18	Supelco	$-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ (monofunctional silane)	10	Yes	6	40–45
Bond Elut	Varian	$-\text{SiC}_{18}\text{H}_{37}$ (trifunctional silane)	17	Yes	6	40–120
Sep-Pak C_{18}	Waters	$-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ (monofunctional silane)	12	Yes	13	55–105
Sep-Pak $\dagger C_{18}$	Waters	$-\text{SiC}_{18}\text{H}_{37}$ (trifunctional silane)	17	Yes	13	37–55
Sorbent from this work C_{18} (thermally immobilized and extracted)			15	No	10	40–63

Table 2

Effect of microwave immobilization (495 W, 900 s) on PMOS sorbed on 5- μ m Spherisorb silica

Stationary phase	N/m^a (plates/meter)	A_t^a	k^a	R_s^b	%C
Without microwave treatment	44 100	2.3	3.5	2.2	4.5
With microwave treatment	94 500	1.5	2.9	2.9	7.3

^a Calculated for the naphthalene peak.^b Calculated for the toluene–naphthalene pair.

of the solid-phase obtained after thermal immobilization of polymer and after extraction of the excess polymer. These results are compared with some commercial sorbents. For commercial sorbents, the

%C ranged from 10 to 17% and for the sorbent obtained in this work the value was 15%. Thus, the proposed method to obtain PMOS-loaded silica, immobilized by thermal treatment, produces a material with similar features to commercial sorbents, especially with respect to the %C, with the advantage of being a much easier, cheaper, less time consuming synthesis process, which uses less toxic solvent than the traditional chemical reaction methods.

3.2. HPLC columns

Table 2 presents values of chromatographic performance parameters for HPLC columns prepared by microwave irradiation. The silica was not previously dried, because the water sorbed on it contributes to fast microwave heating. The results indicate that microwave irradiation produces an improvement in the efficiency of the stationary phase and an immobilization of the polymer on the support. The increment in the values of %C obtained with immobilization, as well as the decrease of the asymmetry factor, are indicative of good coverage of the chromatographic support by PMOS through microwave radiation. The parameters were obtained for a test mixture containing acetone, benzonitrile, benzene, toluene and naphthalene.

Chromatographic separations using columns immobilized by microwave irradiation were utilized to investigate fortified human urine samples to test the applicability of the described analytical procedure. A good separation of the analytes was obtained from spiked urine samples, when compared with a blank sample. Representative chromatograms are shown in Fig. 1.

3.3. Method validation

The linear regression parameters with correlation

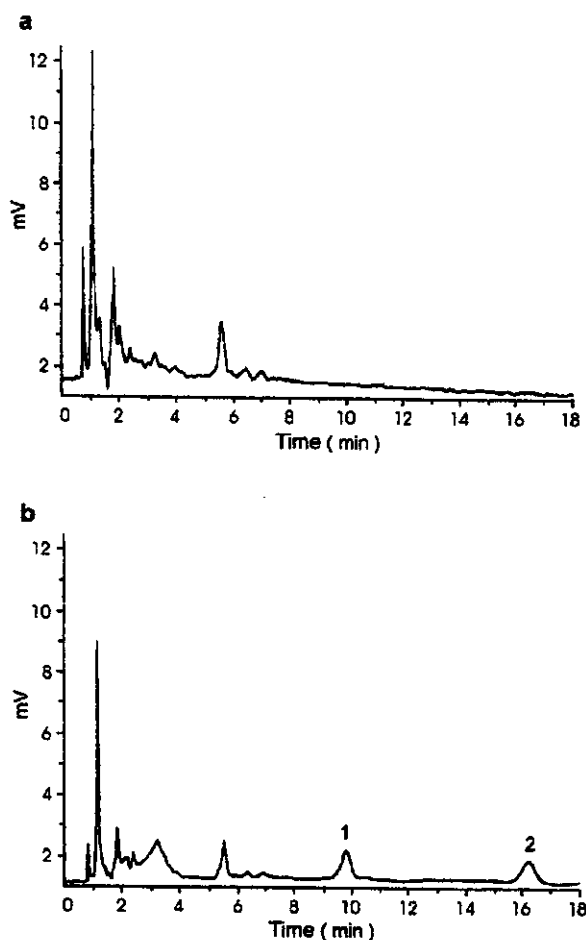


Fig. 1. Chromatograms: (a) blank urine, (b) urine spiked with pesticides. Stationary phase: laboratory-made poly(methylsilyloxane), microwave-immobilized on 5- μ m silica; mobile phase MeCN–water (40:60, v/v); flow-rate 0.8 ml/min; detection UV at 254 nm; injection volume 10 μ l. Elution order: (1) diuron, (2) linuron.

Table 3
Calibration curve and linearity for the herbicides

Herbicide	Calibration curve ^a			Linear interval ($\mu\text{g/l}$)
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i>	
Diuron	308.5	52.3	0.9998	40–1000
Linuron	13.7	45.5	0.9999	60–1500

^a $y = a + bx$, *a*=linear coefficient, *b*=angular coefficient, *r*=correlation coefficient.

Table 5
Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) for the herbicides in matrix matched standards ($n=3$)

Herbicide	LOD ($\mu\text{g/l}$)	LOQ ($\mu\text{g/l}$)	LOD ^a ($\mu\text{g/l}$)	LOQ ^a ($\mu\text{g/l}$)
Diuron	14	40	2.8	8.0
Linuron	22	60	4.5	12

^a LOD and LOQ after 5-fold preconcentration; $n=3$ for all measurements.

Table 4
Precision (intra and inter-assay) and recovery for the SPE–HPLC determination of herbicides

Herbicide	Addition ($\mu\text{g/l}$)	Recovery (%)	Intra-assay precision ($n=3$) RSD (%)	Inter-assay precision (3 days) RSD (%)
Diuron	40	95	1.8	1.6
	80	99	0.38	
	160	103	1.4	
Linuron	60	85	1.5	1.0
	120	98	0.78	
	240	100	0.37	

n, number of replicates.

coefficients (*r*) and parameters of the calibration curves constructed for detection of the herbicide at 254 nm are presented in Table 3.

Table 4 shows the recovery and the intra- and inter-assay precisions of the method. Recoveries were obtained by triplicate analysis of urine spiked with each compound at three levels of fortification for each herbicide.

The average results obtained for herbicide recoveries (Table 4) are very good, 60–100% below 100 $\mu\text{g/l}$ and 80–100% above 100 $\mu\text{g/l}$, recoveries which are considered acceptable [22]. The results of the intra- and inter-assay runs show very good precision, with RSD values between 0.4 and 1.8%, since for biological samples a RSD up to 15% is acceptable [22,26].

The results of LOD and LOQ, before and after preconcentration, are presented in Table 5. All these results are for analysis of urine.

4. Conclusions

The results presented in this paper show that a valid, precise, and specific method using laboratory

prepared SPE and HPLC phases was developed for determination of diuron and linuron compounds in urine, with recoveries, precisions and limits of detection and quantification (Tables 4 and 5) in agreement with the values suggested in the literature.

Fast, easy and effective procedures to obtain silica-based C_{18} -type sorbents for use in SPE and C_8 -type reversed stationary phases for HPLC applications are described. Good recoveries were obtained with SPE sorbents prepared by thermal immobilization of PMODS on silica (Table 4), which can be attributed to PMODS chain crosslinking, giving an extraction phase with excellent retention for these pesticides. The PMOS immobilized on silica by microwave irradiation results in high efficiency HPLC columns (Table 2) with good separation of the herbicides (Fig. 1). The main advantages of the procedures to obtain new SPE and HPLC materials are good performance, lower cost, simplicity and reduction of toxic residues.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support and

fellowships from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and travel support from the Fundo de Apoio ao Ensino e a Pesquisa (FAEP) of UNICAMP. The authors also thank C.H. Collins for helpful discussions and suggestions.

References

- [1] R.H. Hill, D.B. Shealy, S.L. Head, C.C. Williams, S.L. Bailey, M. Gregg, S.E. Baker, L.L. Needham, *J. Anal. Toxicol.* 19 (1995) 323.
- [2] M.D. Beeson, W.J. Driskell, D.B. Barr, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3526.
- [3] M. van Boven, L. Laruelle, P. Daenens, *J. Anal. Toxicol.* 14 (1990) 231.
- [4] E.R. Verheij, J. van der Greef, G.F. La Vos, W. van der Pol, W.M.A. Niessen, *J. Anal. Toxicol.* 13 (1989) 8.
- [5] K. Wittke, H. Hajimiragha, L. Dunemann, J. Begerow, *J. Chromatogr. B* 755 (2001) 215.
- [6] S.C.N. Queiroz, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, *Quim. Nova* 24 (2001) 68.
- [7] E.M. Lores, F.C. Meekins, R.F. Moseman, *J. Chromatogr.* 188 (1980) 412.
- [8] L.F.C. Melo, I.C.S.F. Jardim, *J. Chromatogr. A* 845 (1999) 423.
- [9] L.F.C. Melo, C.H. Collins, K.E. Collins, I.C.S.F. Jardim, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 129.
- [10] R.B. Silva, C.H. Collins, *J. Chromatogr. A* 845 (1999) 417.
- [11] I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, T.A. Anazawa, *J. Chromatogr. A* 849 (1999) 299.
- [12] S. Bachmann, L.F.C. Melo, R.B. Silva, T.A. Anazawa, I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, C.H. Collins, K. Albert, *Chem. Mater.* 13 (2001) 1874.
- [13] E. Tonhi, S. Bachmann, K. Albert, I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, C.H. Collins, *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 97.
- [14] E. Tonhi, K.E. Collins, C.H. Collins, *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 109.
- [15] E. Tonhi, K.E. Collins, I.C.S.F. Jardim, C.H. Collins, *Quim. Nova* 25 (2002) 616.
- [16] S.C.N. Queiroz, L.F.C. Melo, I.C.S.F. Jardim, *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 171.
- [17] H.M. Kingston, L.B. Jessie, in: *Introduction to Microwave Sample Preparation* (ACS Professional Reference Book), Vol. 263, American Chemical Society, Washington, DC, 1998.
- [18] S.L. Cresswell, S.J. Haswell, *J. Chem. Educ.* 78 (2001) 900.
- [19] A. Zlotorzynski, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 25 (1995) 43.
- [20] R. Causon, *J. Chromatogr. B* 689 (1997) 175.
- [21] K.E. Collins, B.C. Franchon, I.C.S.F. Jardim, E. Radovanovic, M.C. Gonçalves, *LC·GC* 18 (2000) 106.
- [22] D.R. Jenke, *Instr. Sci. Technol.* 26 (1998) 1.
- [23] I. Krull, M. Swartz, *LC·GC* 15 (1997) 534.
- [24] A.A.M. Chasin, E.S. Nascimento, L.M.R. Neto, M.E.P.B. Siqueira, M.H. Andraus, M.C. Salvador, N.A.G. Fernicola, R. Gomi, S. Salcedo, *Rev. Bras. Toxicol.* 11 (1998) 1.
- [25] G.W. Peng, W.L. Chiou, *J. Chromatogr.* 531 (1990) 3.
- [26] A.A.M. Chasin, M. Chasin, M.C. Salvador, *Rev. Farm. Bioquim.* 30 (1994) 49.

Poly(methyloctadecylsiloxane) immobilized on silica by γ radiation for use in solid-phase extraction

Sonia C.N. Queiroz, Lúcio F.C. Melo, Isabel C.S.F. Jardim*

Department of Analytical Chemistry, Chemistry Institute, State University of Campinas, P.O. Box 6154, 13083-970 Campinas (SP), Brazil

Abstract

This work presents a fast, easy and effective procedure to obtain silica-based C_{18} type sorbents for use in solid-phase extraction (SPE). The solid-phase was made by depositing a polymer, poly(methyloctadecylsiloxane) (PMODS), on the silica support followed by immobilization using γ irradiation. The method presents an application of green chemistry in the analytical laboratory, since there are no toxic residues after the synthesis. Water samples spiked with a mixture of pesticides (benomyl, tebuthiuron, diuron, simazine, atrazine and ametryn) were extracted in the off-line mode in order to evaluate the performance of this sorbent. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Solid-phase extraction; Sorbents; Gamma irradiation; Poly(methyloctadecylsiloxane); Pesticides

1. Introduction

Solid-phase extraction (SPE) is the most popular technique used in sample pre-treatment prior to analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC). It is used for both environmental [1] and biological [2] analysis. SPE has many advantages over traditional liquid-liquid extraction, such as use of less organic solvent, ease of automation and need for less time and money. It is a multistage rather than a single-stage process; organic compounds undergo multiple equilibrations, leading to good extractions [3]. SPE is used mainly for the following purposes: removal of interferences; preconcentration; sample storage and transport. Bonded phases with C_{18} on silica are the most used sorbents in SPE. Over the years, or-

ganochlorosilanes and organoalkoxysilanes have been used as sililating agents for the preparation of bonded phases [4]. The stability of the $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$ bonds formed between the sililating agents and the hydroxyl groups on the silica surface is the main advantage of these reagents [5]. On the other hand, this method has some limitations, such as: high reagent cost, time consuming procedure, use of toxic solvents and reagents, need to an inert atmosphere and high temperature. A promising alternative method is substitution of the chemical reaction by depositing a polymer on the support and immobilizing using γ irradiation, as has been reported for several HPLC stationary phases, such as, poly(methyloctadecylsiloxane) (PMOS) on zirconized silica [6,7], titanium-grafted silica [8] and pure silica [9]. The main advantages of this procedure are good performance, lower cost, simplicity and reduction of toxic residues. In addition, this method includes the ability to promote reproducible changes and permits complete control of temperature, environment and

*Corresponding author. Tel.: +55-19-3788-3061; fax: +55-19-3788-3023.

E-mail address: icsfj@iqm.unicamp.br (I.C.S.F. Jardim).

additives [6]. Even so, no description was found in the literature using this process to produce sorbents for use in SPE. Thus, this work proposes a procedure to obtain silica-based C_{18} type sorbents for use in SPE. This method is an application of “green” chemistry in the analytical laboratory since there is a considerable reduction of toxic residues during and after sorbent preparation. The solid-phases were made by depositing poly(methyloctadecylsiloxane) (PMODS) on irregular silica, immobilization using γ radiation in different doses followed by solvent extraction of excess polymer. The solid-phases were characterized by thermogravimetry, infrared spectroscopy and elemental (carbon) analysis. Water samples spiked with a mixture of pesticides (benomyl, tebuthiuron, diuron, simazine, atrazine and ametryn) were extracted, using the off-line mode, in order to evaluate the performance of these materials.

2. Experimental

2.1. Chemicals

The following solvents were used in the preparation of the sorbents: *n*-hexane (Mallinckrodt, HPLC-grade), methanol (Mallinckrodt, HPLC-grade) and *n*-pentane (Merck, analytical reagent-grade). Acetonitrile (Tedia, HPLC-grade), water (Milli-Q) and ammonium hydroxide (Synth, reagent-grade) were previously filtered, using a 0.45 μm membrane, to prepare the mobile phase. The pesticide standards atrazine (97.7%), simazine (98.3%) and ametryn (96.8%) were obtained from Novartis, tebuthiuron (99.8%) was kindly donated by Dr Vera Ferracini (EMBRAPA, Brazil) and diuron (99.3%) was obtained from DuPont. The irregular silica was from Fluka; particle size 40–60 μm (200–400 mesh) and pore size 10 nm. PMODS was from Petrarch Silanes and Silicones.

2.2. Preparation of C_{18} loaded support

The support (silica) was dried at 120°C for 24 h. A sufficient quantity of support (silica) was added to a solution of PMODS dissolved in *n*-pentane to give a material with 40% (w/w) of PMODS, then the mixture was stirred gently for 3 h with magnetic

agitation at room temperature, after which the solvent was evaporated slowly at room temperature.

2.3. Irradiation

Two portions of the C_{18} loaded support were placed in glass ampoules which were then sealed under air. The sealed samples were irradiated, using an industrial cobalt-60 source (IBRAS-CBO, Campinas, SP, Brazil), to obtain doses of 60 and 80 kGy.

2.4. Extraction procedure

After the γ irradiation treatment the materials were placed in a stainless-steel tube. This tube was connected to a Waters 510 pump for extraction of all soluble PMODS by passing approximately 25 ml of *n*-hexane per gram of sorbent, at a flow-rate of 2 ml/min. Then, 15 ml of methanol for each gram of material, were passed through the tube, at a flow-rate of 3 ml/min. To make sure that all soluble residues were removed, an extra extraction step was made using a high-pressure packing pump (Haskel), at 1000 p.s.i. (6.9 MPa), in a proportion of 20 ml of methanol per g of sorbent. After extraction, the solid-phase was removed from the tube and the solvent was evaporated at room temperature.

2.5. Solid-phase characterization

Prepared phase was characterized by elemental carbon analysis (using a Perkin-Elmer 240 CHN analyzer), infrared spectroscopy (Perkin-Elmer 1600 FT-IR spectrophotometer) and thermogravimetric analysis (TA Instruments 2050 TGA).

2.6. Cartridge preparation

The cartridges for off-line extraction were prepared using 0.5 g of sorbent packed in a 5 ml syringe made of polypropylene. The material was retained by two polyethylene frits (20 μm pore size).

2.7. Breakthrough volume

To determine the breakthrough volume, a 20×4 mm trace enrichment column packed with sorbent, an auxiliary pump (Waters 510 model) and a six-port

switching valve coupled to a 1090 M LC system (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany), having a ternary gradient pump, a 25 μ l injection loop, a diode array detector (DAD) and Pascal WorkStation software was used. The sample was passed through a pre-column containing the prepared phase at a flow-rate of 5.0 ml/min. The pre-column was enriched with different volumes of sample (10, 20, 30, 50, 75, 100, 200, 300 ml) and a curve in which the peak area is plotted against the sample volume was constructed. After enrichment, the valve was turned to chromatographic column position and the separation was carried out. The analysis conditions were as follows: solvent A, 0.01% (v/v) aqueous NH_4OH (v/v) and solvent B, 0.01% (v/v) NH_4OH in acetonitrile. The gradient profile was: 95% A at 0 min, then linearly to 95% B in 20 min. The flow-rate was 1.0 ml/min. Two wavelengths were set, 220 and 252 nm, while absorbance spectra were recorded from 200 to 400 nm. Analytical separations were carried out on a 250 $\times$ 4.0 mm I.D. analytical column packed with 5 μ m Hypersil octadecylbonded silica.

2.8. Off-line extraction of pesticides

The cartridges were conditioned with 10 ml of methanol and equilibrated with 3 ml of Milli-Q water, without allowing the cartridges to dry. Two different volumes of water samples, connected by PTFE tubes to the conditioned cartridges, were passed through the cartridges at a rate of 5–8 ml/min. The cartridges were then suction dried for 10 min. The sample was eluted with 1 ml of methanol. The extract was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream. For HPLC analysis the residue was dissolved in methanol–water (1:1, v/v). For recovery studies, water samples spiked with 0.1, 1.0 and 10 μ g/l of pesticide were processed. Two replicates of each extraction were carried out.

A commercial SPE cartridge, Supelclean C_{18} (0.5 g) was obtained from Supelco.

HPLC separations were performed with a modular system consisting of the following components: Rheodyne model 7125 injector with a 10 μ l loop, a Waters 600E system controller, a Waters model 484 spectrophotometric detector (used at 235 nm) and a Waters model 746 integrator. The column (150 $\times$ 4.6 mm I.D.) was a Microsorb-MV C_{18} , 5 μ m, and the

guard column (20 $\times$ 2 mm I.D.) was Hypersil C_{18} , 5 μ m.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of γ -irradiated PMODS-loaded silica

Thermogravimetric analysis shows a % (w/w) decrease around 220°C, which can be attributed to degradation of the polymer immobilized onto the silica. However, good thermal stability of these materials, in the temperature range generally used for extraction, is observed. A decrease in mass around 100°C can be attributed to loss of adsorbed water.

Infrared spectra of the support (silica) and of the sorbents (60 and 80 kGy) were obtained. After depositing the polymer onto silica, immobilization and extraction of the excess of PMODS, the following main characteristic bands were observed: 975 cm^{-1} due to silanols, and 2900 cm^{-1} due to the PMODS, implying that the polymer was incorporated onto the support even after extraction with strong solvents such as *n*-hexane.

Table 1 shows the results of the characterization tests, by elemental carbon, of the solid-phases, obtained after immobilization of polymer, at two different doses (60 and 80 kGy), and after extraction of the excess polymer. The results were compared with some commercial sorbents. For commercial sorbents, the %C ranged from 10 to 17% and for the sorbents obtained in this work the value was 12%. Thus, the proposed method to obtain PMODS-loaded silica immobilized by gamma irradiation produces %C similar to the commercial sorbents, with the advantage of being a much easier, cheaper, less time consuming process, which uses less toxic solvent than the traditional methods (chemical reaction) [10].

3.2. Test of the performance of the C_{18} sorbents

3.2.1. Breakthrough volume

The breakthrough volume, V_b , represents the maximum sample volume which can be applied with a theoretical 100% recovery and this measurement can be used for predictions and comparisons among several solid-phases as well. However, the maximum

Table 1

Characteristics of the commercially available C_{18} sorbents and the sorbents obtained by immobilization of PMODS onto silica using gamma irradiation

Commercial name	Company	Type of bonding	% C	End-capped	Pore size (nm)	Particle size (μ m)
Supelclean LC-18	Supelco	$-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ (monofunctional silane)	10	Yes	6	40–45
Bond Elut	Varian	$-\text{SiC}_{18}\text{H}_{37}$ (trifunctional silane)	17	Yes	6	40–120
Sep-Pak C_{18}	Waters	$-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ (monofunctional silane)	12	Yes	13	55–105
Sep-Pak C_{18}	Waters	$-\text{SiC}_{18}\text{H}_{37}$ (trifunctional silane)	17	Yes	13	37–55
Sorbents from this work						
C_{18} (dose 60 kGy)			12	No	10	40–63
C_{18} (dose 80 kGy)			12	No	10	40–63

amount that can be extracted corresponds to the application of a volume equal to V_b , but with a corresponding recovery lower than 100% [11]. Determination of the breakthrough volume is a major optimization step in the development of any analytical method using SPE. Measurement of breakthrough volume can be performed by monitoring continuously or discretely the UV signal at the outlet of a pre-column or cartridge. However, these methods are laborious and time-consuming and relatively high (mg/l) concentrations should be used, which do not reflect real-life situations [11]. Another method has been used for estimating V_b values, where various sample volumes are spiked with the analytes and curves in which the peak areas are plotted against the sample volume are constructed [12]. The point where the curve deviates from linearity is considered to indicate the breakthrough. Due to the advantages of this method, including that the V_b for several analytes can be measured simultaneously, under real experimental conditions, this method was used for determining the V_b of the six pesticides under study, in order to test the performance of the

new solid-phases. Table 2 shows the estimated breakthrough volume for benomyl, tebuthiuron, simazine, atrazine, diuron and ametryn.

According to Table 2, benomyl has the lowest V_b , due to its high polarity. A 200 ml sample volume, with each pesticide at 0.5 μ g/l, was shown to be suitable for enrichment of all the other pesticides.

3.2.2. Water analyses using off-line extraction

The selected herbicides include three classes of pesticides widely used in Brazil. These pesticides have the potential to contaminate drinking water since they are soluble in water. The main concern in pesticide residue analysis is to reach detection limits as low as 0.1 μ g/l, which is the maximum residue limit for drinking water [13]. SPE using C_{18} is a sample preparation technique used to preconcentrate triazine and phenylurea pesticides in water [14]. Thus, cartridges packed with the sorbents prepared in this study were used to preconcentrate the selected pesticides. Three different concentrations (10, 1.0 and 0.1 μ g/l) of each pesticide were spiked in samples of ultra pure water in order to calculate the

Table 2

Estimated breakthrough volumes (V_b) of six pesticides at a concentration 0.5 μ g/l in drinking water

Dose (kGy)	V_b (ml)					
	Benomyl	Tebuthiuron	Simazine	Atrazine	Diuron	Ametryn
60	75	>300	200	200	200	>300
80	100	>300	200	>300	>300	>300

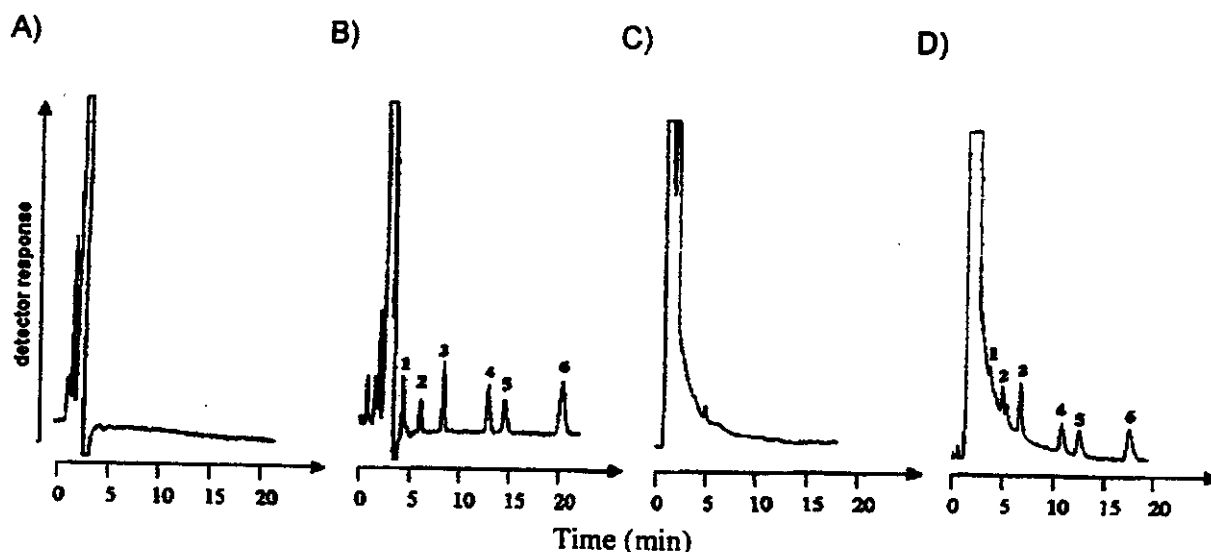


Fig. 1. Chromatograms obtained for a water sample spiked with pesticides. (A) Blank Milli-Q water, (B) spiked Milli-Q water, (C) blank tap water, (D) spiked tap water. 1=benomyl, 2=tebuthiuron, 3=simazine, 4=atrazine, 5=diuron, 6=ametryn. Chromatographic conditions: C_{18} Microsorb-MV HPLC column, 150×4.6 mm I.D. Mobile phase: acetonitrile–water– NH_4OH (40:60:0.1, v/v/v), isocratic elution. Spectrophotometric detection at 235 nm.

recovery for the extractions. Fig. 1 shows the chromatograms corresponding to unspiked samples and the same sample spiked with $0.1 \mu\text{g/l}$ of the pesticide standards, obtained after the preconcentration step. Tap water presented a broad peak at the beginning of the chromatogram, due to humic and fulvic acids present in this type of sample, interfering with the integration of the benomyl and tebuthiuron peaks. Thus, it is necessary to optimize the chromatographic separation, and a clean-up step could be used prior the elution of the sample from the

cartridge to decrease the peak from humic and fulvic acids. However, suitable recoveries and resolution for these peaks, by on-line preconcentration, have been obtained and these results, including method validation, will be presented in a future publication. The recovery values were calculated only for Milli-Q water spiked with the standards. Table 3 shows these results for the recoveries. Good results were obtained with sorbents prepared with radiation doses of both 60 and 80 kGy. Recoveries ranged from 73 to 103% and $RSD < 16\%$ were obtained, using cartridges with

Table 3

Recoveries for Milli-Q water, in %, of tested pesticides using off-line SPE cartridges with PMODS on silica immobilized by γ irradiation at 60 kGy dose ($n=2$) and 80 kGy dose ($n=2$)

Pesticide	Recovery (%)						
	Dose: 60 kGy			Dose: 80 kGy			Supelclean LC-18 $0.1 \mu\text{g/l}^a$
	$0.1 \mu\text{g/l}^a$	$1 \mu\text{g/l}^a$	$10 \mu\text{g/l}^b$	$0.1 \mu\text{g/l}^a$	$1 \mu\text{g/l}^a$	$10 \mu\text{g/l}^b$	
Benomyl	81 ± 11	76 ± 12	99 ± 4	89 ± 1	73 ± 10	96 ± 4	79 ± 2
Tebuthiuron	103 ± 3	97 ± 3	90 ± 5	101 ± 8	97 ± 14	86 ± 6	78 ± 5
Simazine	84 ± 12	101 ± 2	94 ± 8	86 ± 0	85 ± 9	95 ± 3	78 ± 9
Atrazine	96 ± 10	94 ± 2	98 ± 1	85 ± 3	88 ± 3	103 ± 3	74 ± 4
Diuron	91 ± 1	97 ± 1	95 ± 4	94 ± 6	80 ± 5	103 ± 3	79 ± 1
Ametryn	82 ± 8	101 ± 1	94 ± 8	93 ± 3	96 ± 2	102 ± 1	76 ± 4

^a Sample volume=200 ml.

^b Sample volume=20 ml.

0.5 g of sorbent and sample volumes of 20 ml (10 µg/l) and 200 ml (0.1 µg/l and 1 µg/l). A Supelclean C₁₈ (Supelco), 0.5 g, was used for sample enrichment in order to compare the results (recoveries ranged from 74 to 79%).

4. Conclusions

This work presents a fast, easy and effective procedure to obtain silica-based C₁₈-type sorbents for use in SPE.

The breakthrough volumes were estimated and water samples spiked with a mixture of pesticides (benomyl, tebuthiuron, diuron, simazine, atrazine and ametryn) were extracted in the off-line mode in order to test the performance of these sorbents. Good recoveries were obtained with both immobilized sorbents (60 and 80 kGy), which can be attributed to PMODS chain cross-linking, giving solid-phases with excellent retention for these pesticides. The main advantages of this procedure are good performance, lower cost, simplicity and reduction of toxic residues.

Acknowledgements

The authors acknowledge IBRAS-CBO (Campinas, SP, Brazil) for performing the irradiations of stationary phases, financial support and fellowships

from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and travel support from the Fundo de Apoio ao Ensino e a Pesquisa (FAEP) of UNICAMP. The authors also thank C.H. Collins for helpful discussions and suggestions.

References

- [1] C. de la Colina, M.E. Báez, A. Penã, E. Romero, G. Dios, F. Sánchez-Rasero, *Sci. Total Environ.* 153 (1994) 1.
- [2] S.C.N. Queiroz, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, *Quim. Nova* 24 (2001) 68.
- [3] D.L. Mayer, J.S. Fritz, *J. Chromatogr. A* 771 (1997) 45.
- [4] S.O. Akapo, J.-M.D. Dimandja, M.T. Matyska, J.J. Pesek, *J. Microcol. Sep.* 42 (1996) 189.
- [5] J. Nawrocki, A. Dabrowska, *J. Chromatogr. A* 868 (2000) 1.
- [6] L.F.C. Melo, I.C.S.F. Jardim, *J. Chromatogr. A* 845 (1999) 423.
- [7] L.F.C. Melo, C.H. Collins, K.E. Collins, I.C.S.F. Jardim, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 129.
- [8] R.B. Silva, C.H. Collins, *J. Chromatogr. A* 845 (1999) 417.
- [9] I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, T.A. Anazawa, *J. Chromatogr. A* 849 (1999) 299.
- [10] A. Charlesby, *Radiat. Phys. Chem.* 18 (1981) 59.
- [11] M.-C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 3.
- [12] J. Slobodnik, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, *Chromatographia* 50 (1999) 141.
- [13] ECC Drinking Water Guidelines, 80/779/EEC, EEC No. L229/11-29, Brussels, 1980.
- [14] V. Tatarkovicova, R. Machac, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 57 (1992) 2295.