



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química
Tese de Doutorado



Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologias para determinação de resíduos de agrotóxicos em manga por SPME-GC-MS e SPME-HPLC-UV-Vis

Adalberto Menezes Filho

Salvador-BA
2010

Adalberto Menezes Filho

Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologias para determinação de resíduos de agrotóxicos em manga por SPME-GC-MS e SPME-HPLC-UV-Vis

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Afonso de Paula Pereira

Salvador-BA
Março de 2010

TERMO DE APROVAÇÃO

ADALBERTO MENEZES FILHO

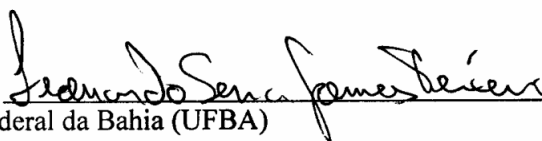
Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologias para determinação de resíduos de agrotóxicos em manga por SPME-GC-MS e SPME-HPLC-UV-Vis

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

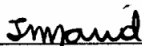
Prof. Dr. Haroldo Silveira Dorea
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal de Sergipe



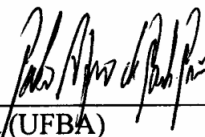
Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia



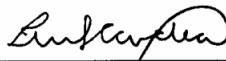
Prof. Dr. Jorge Mauricio David
Doutorado em Química Orgânica, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia



Prof. Dr. Pedro Afonso de Paula Pereira - Orientador
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia



Profa. Dra. Zenilda de Lourdes Cardeal
Doutorado em Chimie. Universite de Paris XI (Paris-Sud), U.P. XI, França
Universidade Federal de Minas Gerais



Salvador, 26 de março de 2010.

Dedico esta conquista a minha maravilhosa esposa Edijane, e aos meus filhos Allan e Alana. Compartilho com vocês mais esta vitória que Deus me concede, por todo carinho, compreensão, abdicção, palavras e ações de incentivo, de ajuda e de amor verdadeiro. Agradeço à Deus a existência de vocês em minha vida.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Pedro Afonso de Paula Pereira pela orientação e apoio neste estudo e pelos seus ensinamentos, que contribuiu muito para a minha formação.
- Ao meu pai Adalberto e minha mãe Maria, por sempre me incentivar a estudar e pelo brilhante exemplo de conduta de vida, pelo amor e dedicação aos seus filhos.
- Ao Prof. Dr. Jailson Bittencourt de Andrade pelas orientações nos breves momentos de conversa.
- Ao Prof. Dr. Haroldo Silveira Dórea da UFS pelas sugestões na avaliação como membro da banca, pelo apoio, incentivo e amizade. Também pelo suporte para a conclusão dos trabalhos experimentais, após o incêndio no IQ-UFBA.
- A Prof. Dr^a. Zenilda de Lourdes Cardeal (UFMG), ao Prof. Dr. Jorge Maurício David (UFBA) e ao Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Texeira (UFBA) por terem avaliado este trabalho e pelas valiosas sugestões nas correções.
- Ao Prof. Dr. Sandro Navickiene pelo apoio e suporte para a realização de parte do trabalho na UFS.
- Ao meu companheiro de bancada Fábio Neves, aluno de IC, que me ajudou muito no desenvolvimento do trabalho. É um jovem com grande potencial.
- Aos amigos Prof. Dr. Anselmo Pinheiro e Prof^a. Dr^a. Elisangela Passos, companheiros de viagem, de estudo e de desabafos ao longo do curso.
- A direção do IFSE pela liberação em tempo integral para a realização dos estudos.
- Ao amigo Lourival, que me recebeu em seu apartamento durante o período de estada em Salvador.

- Aos amigos Dr. Frederico Medeiros e Eliane Souza, pelo apoio e suporte para a realização do trabalho.
- Aos colegas do LPQ: Lilian Lefol, Aline Lefol, Manuela, Daniela, Luciane, Allan Gaujac, Joelma, Sandro, Torquato, Paulo Mesquita, Clícia, Nádia, Talita, Ludmila pelo companheirismo e troca de conhecimentos.
- A Prof^a. Dr^a. Márcio Veloso pelo apoio e incentivo.
- Aos professores do IQ-UFBA: Luis Carvalho, Wilson, Luciana, Gisele Olímpio, Cláudia, Vilma, Maria das Graças, Dr. Celso, Vânia e Sergio Ferreira.
- Aos colegas do IFSE Prof^a Msc. Regivânia Franco, Prof. Msc. Marcelo Miranda, Prof. Msc. Antônio Wilson, Prof. Dr. Ruth Sales e Prof^a Msc. Maria Geovânia pelo apoio e incentivo.
- A Cristóvão e Paulo da secretária do PPGQ-UFBA pelo suporte, atenção e dedicação.
- Ao CNPq, CAPES, FAPESB pelo suporte financeiro, em especial ao CNPq pela bolsa de estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvi
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
1. Introdução	01
2. Fundamentação teórica	06
2.1. Agrotóxicos	06
2.2. Produção de manga	19
2.3. Técnicas para amostragem e análise de resíduos de agrotóxicos em frutas	23
2.4. Microextração em Fase Sólida (SPME)	24
2.4.1. Histórico da SPME e aplicações	24
2.4.2. Otimização do procedimento por SPME	31
2.4.2.1. Tipo de fibra sorvente	31
2.4.2.2. Efeito da temperatura de extração	32
2.4.2.3. Efeito do tempo de extração	32
2.4.2.4. Efeito da velocidade de agitação	33
2.4.2.5. Efeito da força iônica (adição de sal)	34
2.4.2.6. Efeito do pH	34
2.4.2.7. Influência da polaridade no meio	35
2.4.2.8. Tempo de dessorção	35
2.4.2.9. Temperatura de dessorção	36
2.4.3. Aplicações da SPME na determinação de resíduos de agrotóxicos em frutas	36
2.5. Análises de resíduos de agrotóxicos por GC-MS e HPLC-DAD	39
2.6. Parâmetros de validação na análise de resíduos de agrotóxicos	41
3. Objetivos	47
3.1. Objetivo geral	47

3.2. Objetivos específicos	47
4. Materiais e métodos	48
4.1. Materiais	48
4.2. Reagentes e solventes	48
4.3. Preparo das soluções	48
4.4. Limpeza dos materiais	49
4.5. Seleção dos agrotóxicos	49
4.6. Equipamentos	50
4.7. Condições cromatográficas estabelecidas para as análises por GC-MS	52
4.8. Condições cromatográficas estabelecidas para as análises por HPLC-UV-Vis	53
4.9. Aquisição de amostra para o desenvolvimento do método	53
4.10. Procedimento de extração por DI-SPME e dessorção no GC-MS	54
4.11. Procedimento de extração por DI-SPME e dessorção no HPLC-UV-Vis	54
5. Resultados e Discussão	59
5.1. Otimização das condições cromatográficas para as análises por GC-MS	59
5.2. Efeito da matriz	62
5.3. Otimização das condições de extração dos agrotóxicos da matriz manga por SPME para análise por GC-MS	65
5.3.1. Seleção da fibra	65
5.3.2. Seleção do modo de extração	66
5.3.3. Otimização das condições de dessorção	67
5.3.4. Composição da solução para o preparo do extrato	69
5.3.5. Estudo do efeito da temperatura de extração	70
5.3.6. Avaliação do tempo de extração	71
5.3.7. Avaliação da velocidade de agitação	72
5.3.8. Efeito da força iônica e da variação de pH	73
5.3.9. Condições otimizadas para a extração dos agrotóxicos da matriz manga por SPME	76
5.4. Determinação de resíduos de agrotóxicos na matriz manga por DI-SPME-GC-MS	77
5.4.1. Validação do método	77
5.4.1.1. Curvas analíticas (linearidade) e faixas de trabalho	77
5.4.1.2. Sensibilidade	78

5.4.1.3. Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ)	79
5.4.1.4. Precisão do método	81
5.4.1.5. Exatidão do método	82
5.4.2. Aplicação da metodologia desenvolvida por DI-SPME e GC-MS na análise de resíduos de agrotóxicos em amostras comerciais	85
5.5. Determinação de resíduos de agrotóxicos na matriz manga por DI-SPME-HPLC-UV-Vis	87
5.5.1. Otimização das condições cromatográficas para as análises por HPLC-UV-Vis	87
5.5.2. Adaptação para a extração dos agrotóxicos: Mudança de fibra	88
5.5.3. Otimização da dessorção na interface de acoplamento SPME-HPLC	89
5.5.3.1 Avaliação do modo de dessorção	89
5.5.3.2. Avaliação do tempo de dessorção	91
5.5.4. Validação do método	92
5.5.4.1. Curvas analíticas (linearidade) e faixas de trabalho	92
5.5.4.2. Sensibilidade	93
5.5.4.3. Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ)	94
5.5.4.4. Precisão do método	96
5.5.4.5 Exatidão do método	97
5.5.5. Aplicação da metodologia desenvolvida por DI-SPME-HPLC-UV-Vis na análise de resíduos de agrotóxicos em amostras comerciais	99
5.6. Comparação dos resultados obtidos por DI-SPME-GC-MS e DI-SPME-HPLC-UV-Vis	102
5.7. Identificação de interferentes provenientes da matriz	105
6. Conclusões	113
7. Perspectivas para trabalhos futuros	115
8. Referências bibliográficas	116
9. Anexos	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Comparação das vendas de agrotóxicos entre os meses de janeiro e outubro de 2007 e 2008	07
Tabela 02. Classificação toxicológica dos agrotóxicos (ANVISA, 2005)	08
Tabela 03. Estrutura química, grupo químico e características físico-químicas dos compostos estudados	15
Tabela 04. Características de fibras para SPME disponíveis comercialmente	30
Tabela 05. Resumo das aplicações da SPME na análise de resíduos de agrotóxicos em vegetais, frutas frescas e seus derivados	37
Tabela 06. Comparação entre os critérios adotados pela ANVISA e INMETRO para a validação de métodos analíticos	42
Tabela 07. Tempos de retenção, íon de quantificação e íons qualificadores de cada composto	60
Tabela 08. Variáveis otimizadas e seus respectivos valores para a extração dos compostos estudados na matriz manga por meio da SPME e análise por GC-MS	76
Tabela 09. Equações por regressão linear, coeficientes de determinação (R^2) e faixa linear de trabalho obtidos na análise por DI-SPME-GC-MS e LMR	78
Tabela 10. Estudo da sensibilidade do método desenvolvido no intervalo de 33,3 a 1665,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	79
Tabela 11. Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) obtidos com o método desenvolvido por DI-SPME e GC-MS e LMR	80
Tabela 12. Coeficientes de variação obtidos no estudo da precisão do método desenvolvido por DI-SPME e GC-MS	81
Tabela 13. Recuperações relativas e RSD (%) em diferentes níveis de fortificação	83
Tabela 14. Recuperação absoluta e RSD (%)	84
Tabela 15. Resultados obtidos e desvio-padrão das análises por DI-SPME e GC-MS das amostras comerciais	86
Tabela 16. Equações obtidas por regressão linear, coeficientes de correlação (R^2) e faixas lineares de trabalho na análise por DI-SPME-HPLC-UV-VIS	93
Tabela 17. Estudo da sensibilidade do método no intervalo de 10,0 a 250,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	93
Tabela 18. Limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ) obtidos para os agrotóxicos estudados por SPME-HPLC-UV-Vis	94

Tabela 19. Estudo da precisão por SPME-HPLC-UV-Vis em dois níveis de fortificação	96
Tabela 20. Recuperações relativas e RSD (%) em três níveis de fortificação e a recuperação absoluta e RSD (%).	98
Tabela 21. Resultados obtidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) e desvios-padrão ($n = 3$) das análises por DI-SPME-HPLC-UV-Vis das amostras comerciais	101
Tabela 22. Comparação dos limites de quantificação, precisão e exatidão dos métodos desenvolvidos	104
Tabela 23. Comparação das recuperações relativas e absoluta obtidas por SPME-GC-MS e SPME-HPLC-UV-Vis, usando-se o teste $t_{95\%}$ de Student com um nível De de confiança de 95%.	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Estrutura da parationa metílica	10
Figura 02. Estrutura da parationa etílica	10
Figura 03. Estrutura do ácido carbâmico	11
Figura 04. Fórmula geral dos carbamatos	11
Figura 05. Estrutura química do ácido crisantêmico	11
Figura 06. Estrutura do benzimidazol	12
Figura 07. a. Estrutura do 1,2,3-triazol e b. Estrutura do 1,2,4-triazol	13
Figura 08. a. Estrutura da 1,2,3,4-tetrazina e b. Estrutura da 1,2,4,5-tetrazina	14
Figura 09. Evolução da produção de manga entre os anos de 1900 e 2007	20
Figura 10. Principais frutas frescas exportadas pelo Brasil em 2007	20
Figura 11. Etapa de sorção dos analitos na fase quimicamente ligada à fibra	25
Figura 12. Extração por SPME com imersão direta	26
Figura 13. Extração por SPME com <i>headspace</i>	26
Figura 14. Etapa de dessorção térmica dos analitos no injetor do cromatógrafo a gás	27
Figura 15. Etapa de dessorção dos analitos na cromatografia líquida	28
Figura 16. Interface para o acoplamento SPME-HPLC	28
Figura 17. Influência do tempo de extração sobre a resposta analítica	33
Figura 18. Sistema SPME-GC-MS utilizado na determinação e otimização das condições de extração dos agrotóxicos na matriz manga	50
Figura 19. Sistema utilizado no desenvolvimento das condições cromatográficas para análise dos agrotóxicos por SPME-HPLC-DAD	51
Figura 20. Sistema utilizado para a determinação de resíduos de agrotóxicos da matriz manga por SPME-HPLC-UV-Vis	52
Figura 21. Interface SPME-HPLC com destaque para as posições “load” e “inject” e a vedação da interface	55
Figura 22a. Desbloqueio do selo	56
Figura 22b. Desbloqueio do selo	56
Figura 23. Retirando a agulha da interface	56
Figura 24. Introduzindo a fibra na interface	56
Figura 25. Exposição da fibra na câmara	57

Figura 26. Dessorção em ACN (15 min)	57
Figura 27. Abertura do grampo	57
Figura 28. . Removendo o <i>holder</i> da interface	57
Figura 29a. Válvula na posição “load”	58
Figura 29b. Válvula na posição “inject”	58
Figura 30. Cromatograma obtido por GC-MS (modo SIM) na injeção de 1,0 µL de uma mistura padrão dos agrotóxicos na concentração de 1,0 mg L ⁻¹ . Identificação dos picos: 1. clofentezina; 2. carbofuran; 3. diazinon; 4. parationa metílica; 5. malationa; 6. fentiona; 7. tiabendazol; 8. imazalil; 9. bifentrina; 10 e 11. permetrina; 12. procloraz; 13. piraclostrobina; 14 e 15. difenoconazol; 16. azoxistrobina.	60
Figura 31. Cromatograma obtido por GC-MS (modo SIM) na extração dos agrotóxicos por DI-SPME, efetuada na matriz manga fortificada a 50 µg kg ⁻¹ . Identificação dos picos: 1. clofentezina; 2. carbofuran; 3. diazinon; 4. parationa metílica; 5. malationa; 6. fentiona; 7. tiabendazol; 8. imazalil; 9. bifentrina; 10 e 11. permetrina; 12. procloraz; 13. piraclostrobina; 14 e 15. difenoconazol; 16. azoxistrobina.	61
Figura 32. Cromatograma obtido por GC-MS (modo SIM) na extração por DI-SPME, efetuada no extrato da matriz manga (branco da matriz)	61
Figura 33. Comparação da resposta analítica da fentiona obtida por SPME e análise por GC-MS, quando o composto é preparado em água e no extrato da matriz	63
Figura 34. Comparação da resposta analítica do difenoconazol obtida por SPME e análise por GC-MS, quando o composto é preparado em água e no extrato da matriz	63
Figura 35. Comparação da resposta analítica da bifentrina obtida por SPME e análise por GC-MS, quando o composto é preparado em água e no extrato da matriz.	64
Figura 36. Comparação entre as eficiências de extração das diferentes fibras avaliadas. Extrações realizadas com imersão direta a 60°C por 30 min, com agitação de 300 rpm e com a matriz fortificada (50 µg kg ⁻¹). Dessorção a 300°C por 5 min.	66
Figura 37. Comparação da eficiência na extração dos agrotóxicos da matriz manga por DI-SPME e HS-SPME (Agrotóxicos em ordem crescente de pressão de vapor). Extrações realizadas com a fibra de PA a 60°C por 30 min, com agitação de 300 rpm e com a matriz fortificada (50 µg kg ⁻¹). Dessorção a 300°C por 5 min.	67
Figura 38. Avaliação da temperatura de dessorção. Extrações realizadas com imersão direta da fibra de PA a 60°C por 30 min, com agitação de 300 rpm e com a matriz fortificada (50 µg kg ⁻¹). Dessorção por 5 min.	68
Figura 39. Avaliação do tempo de dessorção. Extrações realizadas com imersão	

direta da fibra de PA a 60°C por 30 min, com agitação de 300 rpm e com a matriz fortificada (50 µg kg⁻¹). Dessorção a 280°C. 68

Figura 40. Comparação da eficiência da mistura água:isopronol em diferentes proporções para a extração dos agrotóxicos por DI-SPME com a fibra de PA a 60°C por 30 min, com agitação de 300 rpm e com a matriz fortificada (50 µg kg⁻¹). Dessorção a 280°C por 5 min. 70

Figura 41. Influência da temperatura na eficiência da extração por DI-SPME com a fibra de PA por 30 min, com agitação de 300 rpm e com a matriz fortificada (50 µg kg⁻¹). Dessorção a 280°C por 5 min. 71

Figura 42. Avaliação da influência do tempo na eficiência da extração dos agrotóxicos em manga por DI-SPME com a fibra de PA a 50°C, com agitação de 300 rpm e com a matriz fortificada (50 µg kg⁻¹). Dessorção a 280°C por 5 min. 72

Figura 43. Eficiência de extração em função da velocidade de agitação. Extrações realizadas com imersão direta da fibra de PA a 50°C por 30 min, com a matriz fortificada (50 µg kg⁻¹). Dessorção a 280°C por 5 min. 73

Figura 44. Influência da força iônica na eficiência da extração por adição de NaCl. Extrações realizadas com imersão direta da fibra de PA a 50°C por 30 min, com agitação de 250 rpm e com a matriz fortificada (50 µg kg⁻¹). Dessorção a 280°C por 5 min. 74

Figura 45. Influência da força iônica na eficiência da extração por ajuste do pH (adição de HCl e NaOH). Extrações realizadas com imersão direta da fibra de PA a 50°C por 30 min, com agitação de 250 rpm e com a matriz fortificada (50 µg kg⁻¹). Dessorção a 280°C por 5 min. 75

Figura 46. Cromatograma obtido por DI-SPME-HPLC-UV-Vis com fortificação da matriz a 250 µg kg⁻¹. Coluna de fase reversa XTerra® MS C₁₈ 5 µm (250 mm x 2.1 mm), fase móvel água (A) e acetonitrila (B), 30% de B (início), 70% de B (6 min), 80% de B (18 min), 100% de B (22 - 32 min), 30% de B (35 - 42 min), fluxo de 0,25 mL min⁻¹. O detector UV-Vis operou em 203 nm (0 - 26,5 e 31- 42 min) e em 245 nm (26,5 - 31 min). 88

Figura 47. Cromatograma obtido a partir da dessorção dinâmica na interface SPME-HPLC. Coluna de fase reversa XTerra® MS C₁₈ 5 µm (250 mm x 2.1 mm), fase móvel água (A) e acetonitrila (B), 30% de B (início), 70% de B (6 min), 80% de B (18 min), 100% de B (22 - 32 min), 30% de B (35 - 42 min), fluxo de 0,25 mL min⁻¹. O detector UV-Vis operou em 203 nm (0 - 26,5 e 31- 42 min) e em 245 nm (26,5 - 31 min). 90

Figura 48. Cromatograma obtido a partir da dessorção estática (ACN) na interface SPME-HPLC. Coluna de fase reversa XTerra® MS C₁₈ 5 µm (250 mm x 2.1 mm), fase móvel água (A) e acetonitrila (B), 30% de B (início), 70% de B (6 min), 80% de B (18 min), 100% de B (22 - 32 min), 30% de B (35 - 42 min), fluxo de 0,25 mL min⁻¹. O detector UV-Vis operou em 203 nm (0 - 26,5 e 31- 42 min) e em 245 nm (26,5 - 31 min). 90

Figura 49. Avaliação do tempo de desorção (modo estático) na interface SPME-HPLC. Extrações com imersão direta da fibra de PA a 50°C por 30 min, com agitação de 250 rpm e com a matriz fortificada (50 µg kg ⁻¹).	91
Figura 50. Cromatograma obtido por DI-SPME-HPLC-UV-Vis com a fortificação da matriz na concentração de 5,0 µg kg ⁻¹ . Coluna de fase reversa XTerra® MS C ₁₈ 5 µm (250 mm x 2.1 mm), fase móvel água (A) e acetonitrila (B), 30% de B (início), 70% de B (6 min), 80% de B (18 min), 100% de B (22 - 32 min), 30% de B (35 - 42 min), fluxo de 0,25 mL min ⁻¹ . O detector UV-Vis operou em 203 nm (0 – 26,5 e 31- 42 min) e em 245 nm (26,5 – 31 min).	95
Figura 51. Cromatograma (modo SCAN) de extrato de amostra de manga obtido por SPME-GC-MS, indicando a presença do interferente	105
Figura 52. Espectro de massas do interferente extraído da matriz e obtido por impacto de elétrons (70 eV)	106
Figura 53. Espectro de massas do composto com maior similaridade com o espectro do interferente extraído da matriz e obtido por impacto de elétrons (70 eV)	106
Figura 54. Espectro de massas obtido por ionização química com a formação do íon m/z = 127, correspondendo ao íon [M+H] ⁺	107
Figura 55. Espectro de massas (MS/MS) obtido na fragmentação do íon 127 m/z com energia de colisão de 10 eV	108
Figura 56. Espectro de massas (MS/MS) obtido na fragmentação do íon 127 m/z com energia de colisão de 15 eV	108
Figura 57. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons para o padrão de 5-HMF	109
Figura 58. Estrutura química do 5-hidroxi-metilfurfural (5-HMF)	109
Figura 59. Mecanismo de formação do furfural, 5-HMF e formaldeído a partir da pirólise da frutose	110
Figura 60. Cromatograma obtido por HPLC-UV-Vis na injeção de 20,0 µL de 5-HMF nas concentrações de 0,5 mg L ⁻¹ (Preto) e 1,0 mg L ⁻¹ (Vermelho). Eluição no modo isocrático (Metanol:água, 20:80 v/v) com coluna C ₁₈ (250 mm x 2.1 mm I.D, 5µm) e leitura a 285 nm.	111
Figura 61. Cromatograma obtido por DI-SPME-HPLC-UV-Vis, desorção dinâmica com a fase móvel. Eluição no modo isocrático (Metanol:água 20:80 v/v) com coluna C ₁₈ (250 mm x 2.1 mm I.D, 5µm) e detector (285 nm).	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Andef	Associação Nacional de Defesa de Vegetal
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHC	Hexaclorociclohexano
CV	Coefficiente de Variação
Carboxen/DVB	Carboxen/Divinil benzeno
Carboxen/PDMS	Carboxen/Polidimetilsiloxano
CI	<i>Chemistry Ionization</i> (Ionização Química)
CW	<i>Carbowax</i>
CW/TR	<i>Carbowax/Template resin</i>
CW/DVB	Carbowax/Divinilbenzeno
DAD	Detector por Arranjo de Diodos
DDT	Dicloro Dietil Tricloroetano
DI	<i>Direct Imersion</i> (Imersão Direta)
DI-SPME	<i>Direct imersion-Solid Phase Microextraction</i> (Microextração em Fase Sólida por Imersão Direta)
DVB-Carb-PDMS	Divinilbenzeno-Carboxen-Polidimetilsiloxano
DL ₅₀	Dose Letal
ECD	<i>Electron Capture Detector</i> (Detector de Captura de Elétrons)
EI	<i>Electron Impact</i> (Impacto de Elétrons)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)
FPD	<i>Flame Photometric Detector</i> (Detector Fotométrico por Chama)
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de Ionização por Chama)
FMAE	<i>Foccus Microwave-Assisted Extraction</i> (Extração Assistida por Micro-ondas Focalizada)
GC	<i>Gas Chromatograph</i> (Cromatografia a gás)
GC/ECD	<i>Gas Chromatograph/Electron Capture Detector</i> (Cromatografia a gás/Detector de Captura de Elétrons)
GC/FID	<i>Gas Chromatograph/Flame Ionization Detector</i> (Cromatografia a gás/Detector de Ionização por Chama)
GC/FPD	<i>Gas Chromatograph/Flame Photometric Detector</i> (Cromatografia a gás/Detector Fotométrico por Chama)
GC-MS	<i>Gas Chromatograph-Mass Spectrometry</i> (Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas)
GC/NPD	<i>Gas Chromatograph/Nitrogen Phosphorus Detector</i> (Cromatografia a Gás/Detector Nitrogênio-Fósforo)
HMF	Hidroxi-metilfurfural
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HPLC-DAD	<i>High Performance Liquid Chromatography/Diode Array Detector</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Detector por Arranjo de Diodos)

HPLC-MS	<i>High Performance Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas)
HPLC-UV-Vis	<i>High Performance Liquid Chromatograph-Ultra violeta-Visible</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Ultravioleta-Visível)
HS-SPME	<i>Headspace-Solid Phase Microextraction</i> (Microextração em Fase Sólida no Modo Headspace)
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (União Internacional de Ciências Puras e Aplicadas)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
Ibraf	Instituto Brasileiro de Frutas
LC-MS	<i>Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massas)
LC-DAD	<i>Liquid Chromatograph/Diode Array Detector</i> (Cromatografia Líquida-Detector por Arraço de Diodos)
LC/PIF/FID	<i>Liquid Chromatograph/Photochemically Induced Fluorimetry/Flame Ionization Detector</i> (Cromatografia Líquida/Fluorimetria por Indução Fotoquímica/Detector de Ionização por Chama)
LC-FLD	<i>Liquid Chromatograph/ Postcolumn Fluorescence Derivatization</i> (Cromatografia Líquida/Derivatização Pós-coluna por Fluorescência)
LC-ESI-MS/MS	<i>Liquid Chromatograph/Eletrospray Ionization-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida/Ionização por Eletrospray-Espectrômetro de Massa/Espectrômetro de Massa)
LLE	<i>Liquid Liquid Extraction</i> (Extração Líquido-Líquido)
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Limite de Detecção)
LOQ	<i>Limit of Quantification</i> (Limite de Quantificação)
LPME	<i>Liquid Phase Microextraction</i> (Microextração em Fase Líquida)
IDA	Índice Diário Aceitável
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrômetro de Massas)
MM	Massa molecular
MSPD	<i>Matrix Solid Phase Dispersion</i> (Dispersão da Matriz em Fase Sólida)
NPD	<i>Nitrogen Phosphorus Detector</i> (Detector Nitrogênio-Fósforo)
NCI	<i>Negative Chemistry Ionization</i> (Ionização Química no Modo
Negativo)	
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPP	Organofosforados
PA	Poliacrilato
PCI	<i>Positive Chemistry Ionization</i> (Ionização Química no Modo Positivo)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano/Divinil benzeno
pH	Potencial hidrogeniônico
ppt	Parte por trilhão
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> (Desvio Padrão Relativo)
SPME-HPLC	<i>Solid Phase Microextraction-High Performance Liquid Chromatograph</i> (Microextração em Fase Sólida-Cromatografia Líquida de Alta eficiência)

SEAGRI	Secretária da Agricultura do Estado da Bahia
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extração com Fluido Supercrítico)
SIM	<i>Single Ion Monitoring</i> (Monitoramento do Íon Seleccionado)
SINDAG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida)
SPME	<i>Solid Phase Micro Extraction</i> (Microextração em Fase Sólida)
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoracético
TOF	<i>Time of Flight</i> (Tempo de Voo)
USA	<i>United States of América</i> (Estados Unidos da América)
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

RESUMO

Foram desenvolvidas, validadas e aplicadas duas metodologias analíticas por SPME e análise por GC-MS e HPLC-UV-Vis, para determinar resíduos de agrotóxicos em manga. 14 compostos foram analisados por GC-MS (clofentezina, carbofuran, diazinon, parationa, malationa, fentiona, tiabendazol, imazalil, bifentrina, permetrina, procloraz, piraclostrobina, difenoconazol, azoxistrobina) e 10 por HPLC-UV-Vis (tiabendazol, carbofuran, azoxistrobina, procloraz, fentiona, clofentezina, permetrina, abamectina, carbosulfan e bifentrina). Diferentes parâmetros que influenciam na eficiência da extração foram avaliados (Tipo de fibra, modo de extração, temperatura e tempo de extração e dessorção, velocidade de agitação e força iônica). Os melhores resultados foram obtidos com fibra de PA e DI a 50°C por 30 min, com agitação a 250 rpm e dessorção por 5 min a 280°C no GC-MS e no modo estático por 15 min na interface SPME-HPLC. Na validação foram avaliados o efeito da matriz, a linearidade das curvas analíticas, LOD, LOQ, precisão e exatidão. O método por SPME-GC-MS apresentou linearidade entre 3,3 e 1665,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, LOD entre 1,0 e 3,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e LOQ entre 3,3 e 33,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O método por SPME-HPLC-UV-Vis apresentou linearidade entre 2,0 e 250,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, LOD entre 0,6 e 3,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e LOQ entre 2,0 e 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Nos dois métodos foram obtidos CV menores que 20%. Os métodos foram aplicados na análise de amostras coletadas em Salvador-BA e Aracaju-SE. Nas amostras de Salvador foram detectados resíduos de sete compostos e nas de Aracaju resíduos de cinco compostos. Entretanto, as concentrações estavam abaixo dos valores estabelecidos pela Legislação Brasileira.

Palavras chaves: Manga, Resíduos de agrotóxicos, SPME, GC-MS, HPLC-UV-Vis.

ABSTRACT

Were developed, validated and applied two analytical methodologies by SPME and GC-MS and HPLC-UV-Vis analysis to determine pesticide residues in mango. 14 compounds were analyzed by GC-MS (clofentezine, carbofuran, diazinon, methyl parathion, malathion, fenthion, thiabendazole, imazalil, bifenthrin, permethrin, prochloraz, pyraclostrobin, difenoconazole, azoxystrobin) and 10 for HPLC-UV-Vis (thiabendazole, carbofuran, azoxystrobin, prochloraz, fenthion, clofentezine, permethrin, abamectin, bifenthrin and carbosulfan). Different parameters influencing the extraction efficiency were evaluated (fiber type, extraction mode, temperature, extraction and desorption times, stirring velocities and ionic strength). The best results were obtained using PA fiber and DI mode at 50°C for 30 min, along with stirring at 250rpm and desorption for 5 min at 280°C in the GC-MS and static mode for 15 min in the SPME-HPLC interface. For validation, we assessed the matrix effect, the linearity of calibration curves, LOD, LOQ, precision and accuracy. The method for SPME-GC-MS showed linearity between 3.3 and 1665.0 mg kg⁻¹, LOD between 1.0 and 3.3 µg kg⁻¹ and LOQ between 3.3 and 33.3 µg kg⁻¹. The method for SPME-HPLC-UV-Vis showed linearity between 2.0 and 250.0 µg kg⁻¹, LOD between 0.6 and 3.3 µg kg⁻¹ and LOQ between 2.0 and 10.0 µg kg⁻¹. In both methods were obtained CV below 20%. The methods were applied in the analysis of samples collected in Salvador-BA and Aracaju-SE. In samples from Salvador seven compounds residues were detected and in samples from Aracaju five compounds residues were detected. However, the concentrations were below the values established by Brazilian legislation.

Key words: Mango, Pesticides residues, SPME, GC-MS, HPLC-UV-Vis.

1. Introdução

Desde a década de 1950, quando se iniciou a “revolução verde”, foram observadas profundas mudanças na agricultura bem como em seus impactos sobre o ambiente e a saúde humana. Novas tecnologias, muitas delas baseadas no uso extensivo de agentes químicos, foram disponibilizadas para o controle de doenças, aumento da produtividade e proteção contra insetos e outras pragas [Moreira *et al.*, 2002]. Entretanto, é relatado que há mais de dois mil anos os agricultores já utilizavam substâncias que prevenissem os danos causados por pragas. Um dos primeiros recursos utilizados foi o enxofre. Atualmente o controle de pragas e ervas daninhas nas plantações agrícolas é feito com o uso extensivo dos agrotóxicos.

Não se pode negar que a utilização dos fertilizantes em conjunto com a mecanização das lavouras e a utilização dos agrotóxicos de forma racional no combate a pragas nas diversas culturas agrícolas proporcionou um aumento de produtividade para atender a crescente demanda por alimentos. Com esta finalidade, o uso de agrotóxicos na agricultura é oficialmente permitido pelos órgãos governamentais, após registro de suas formulações para as diversas culturas nas quais serão utilizados [Menezes Filho, 2005]. Contudo, é importante ressaltar que apesar de alguns “benefícios”, os agrotóxicos como um todo tem representado um grande risco à preservação do meio ambiente e à saúde pública [Chu *et al.*, 2005]. O seu uso incorreto acarreta grandes problemas ao ambiente, contaminando solos, rios, lençóis freáticos e a atmosfera, atingindo assim, de forma direta ou indireta, a saúde do ser humano. Mesmo que empregados de modo correto, os agrotóxicos podem causar problemas de saúde pública ou ambiental. Uma possibilidade é a de causar desequilíbrio nos sistemas ecológicos, favorecendo o ataque de pragas desconhecidas, além do efeito indesejado em insetos polinizadores. A resistência desenvolvida por determinadas pragas é outro problema que exige aplicações de agrotóxicos em maior quantidade, ou a troca de um princípio ativo por outro [Medeiros, 2008].

A contaminação humana por agrotóxicos pode ocorrer por três vias. A via ocupacional é a que se caracteriza pela contaminação dos trabalhadores que manipulam essas substâncias seja na formulação, utilização ou na colheita. Embora atinja uma parcela mais reduzida da população, esta via é responsável por mais de 80% dos casos de intoxicação por agrotóxicos. A via ambiental caracteriza-se pela dispersão/distribuição dos agrotóxicos ao longo dos diversos compartimentos do ambiente (contaminação das águas, atmosfera e do solo); e a via

alimentar, que está mais relacionada ao nosso objetivo de estudo, que caracteriza-se pela contaminação por ingestão de alimentos com consideráveis quantidades remanescentes de agrotóxicos. O impacto sobre a saúde provocado por esta via é comparativamente menor, devido a diversas razões, tais como a menor concentração dos resíduos que permanecem nos produtos; a possibilidade de eliminação dos agrotóxicos por processos de beneficiamento do produto (cozimento, fritura, etc.); o respeito ao período de carência, etc. Esta via atinge uma parcela ampla da população urbana, os consumidores [Moreira *et al.*, 2002].

A presença destes contaminantes nos alimentos pode advir da aplicação direta em uma das fases da produção, no transporte ou no armazenamento dos gêneros alimentícios [Araújo *et al.*, 1999]. Para minimizar este problema é necessário que os agricultores utilizem os produtos comerciais na dosagem correta para cada cultura agrícola e respeitem o prazo de carência que existe para cada princípio ativo presentes nos diversos produtos comercializados. Cada princípio ativo possui um tempo de meia-vida para se degradar ou ser metabolizado. Se este período não for respeitado, o alimento pode chegar ao consumidor contaminado. Estas quantidades remanescentes de agrotóxicos nos alimentos são denominadas de resíduos [Sobrinho & Dórea, 2004].

A preocupação com a presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos é tão antiga quanto a introdução destes produtos químicos no controle de pragas e doenças que afetam a produção agrícola. Estudos relatam que alguns agrotóxicos tais como o DDT e os organofosforados diazinona, parationa metílica e malationa são agentes químicos com grande potencial mutagênico [Bolognesi & Morasso, 2000]. Apesar disso, somente em anos mais recentes o avanço do conhecimento científico e as novas tecnologias da área laboratorial, vêm permitindo uma avaliação mais eficaz na determinação da quantidade de resíduos de agrotóxicos nos alimentos, com o objetivo de garantir uma melhor qualidade dos produtos que chegam à mesa da população. Uma atitude muito importante neste sentido foi à criação do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que nos últimos quatro anos tem monitorando, por meio deste programa, nove culturas, cujos produtos estão presentes na mesa dos brasileiros [ANVISA (a), 2006].

Os alimentos que são consumidos pelo homem na forma *in natura*, principalmente aqueles que são consumidos com a casca, constituem uma das principais formas de contaminação indireta e involuntária por agrotóxicos pelo homem. A presença de resíduos em

frutas e vegetais pode ser uma importante rota de exposição do homem a estes compostos [Navarro *et al.*, 2002]. Por este motivo foram estabelecidos limites máximos de resíduos¹ (LMR), os quais são determinados através de dados toxicológicos e da ingestão diária aceitável² (IDA) em alimentos para assegurar que seus níveis não causem risco à saúde da população [Menezes Filho, 2005].

O artigo 94 do decreto 4.074, de 4 de janeiro de 2002, do Ministério da Saúde, cria o SIA (Sistema Integrado de Informações sobre Agrotóxicos) que contém os índices das monografias dos ingredientes ativos dos agrotóxicos com emprego autorizado, com os respectivos LMR para cada binômio pesticida/cultura [Brasil, 2002]. A definição dos limites de produtos aceitáveis nos alimentos é um conceito em constante mudança. Há 20 anos a falta de tecnologias mais eficientes fazia dos níveis toleráveis de agrotóxicos em alimentos uma verdadeira incógnita. Atualmente, as taxas aceitáveis são revistas a todo o momento. A população de forma geral pode estar sob risco de exposição crônica aos agrotóxicos, se estiver ingerindo alimentos contendo resíduos acima dos LMR.

Com o intuito de minimizar a quantidade de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais, foram realizados alguns estudos envolvendo a imersão do alimento em água ozonizada, levando em conta o elevado potencial oxidante do ozônio. Os resultados demonstraram que alguns agrotóxicos, como o carbofuran [Benitez, Acero, & Real, 2002], clorofenilurea [Tahmasseb *et al.*, 2002], malationa [Masten *et al.*, 2001] e mais recentemente parationa metílica, diazinona e cipermetrina [Wu *et al.*, 2007] podem ser facilmente degradados por ação do ozônio, quando estes compostos estão em solução aquosa. No entanto, este procedimento é menos efetivo ou inadequado na remoção dos agrotóxicos sistêmicos que também atuam no interior dos frutos e vegetais. Ao penetrar nos tecidos vegetais, resíduos podem aparecer em produtos processados, tais como sucos de frutas, que são amplamente consumidos, particularmente por crianças que são mais susceptíveis aos produtos químicos [Albero *et al.*, 2005].

¹ O Limite Máximo de Resíduo é definido como a concentração máxima de resíduos de um pesticida para que se permita legalmente seu uso na superfície ou na parte interna de produtos alimentícios para consumo humano e de animais (FAO/OMS, 1994)

² IDA – Dose diária que ingerida durante toda vida, parece não apresentar riscos apreciáveis para a saúde do consumidor, à luz dos conhecimentos atuais na avaliação de uma substância química (FAO/OMS, 1994).

O controle de resíduos em alimentos é necessário, tanto para a proteção direta do consumidor como em relação à aceitabilidade da mercadoria no comércio. Seus resultados podem ser usados para introduzir medidas corretivas de prevenção de risco à saúde. Devido à possibilidade da presença de vários princípios ativos ou seus metabólitos, torna-se muito difícil especificar um único procedimento analítico que determine satisfatoriamente o grau de contaminação de um alimento.

Para a determinação de resíduos de agrotóxicos nos alimentos é necessário usar um procedimento validado para a situação ou adaptar e validar um procedimento aceitável para circunstâncias particulares envolvidas, tais como a natureza da amostra e do resíduo e as interferências a serem encontradas. Portanto, torna-se necessário desenvolver métodos analíticos com alta sensibilidade para a determinação de resíduos em diversas matrizes.

Em geral, alimentos e amostras ambientais não são analisadas sem uma preparação preliminar da amostra, tendo em vista que os contaminantes estão presentes em baixas concentrações e as matrizes são complexas [Ahmed, 2001]. O preparo da amostra é a etapa mais crítica na determinação de resíduos em alimentos, visto que, amostras biológicas apresentam composições químicas complexa, exigindo técnicas de extração que possibilitem maior seletividade e concentração dos analitos, possibilitando a determinação destes resíduos em níveis cada vez menores.

Métodos convencionais de análises de resíduos em alimentos são trabalhosos, envolvendo extrações manuais com vários passos para a concentração dos analitos, exigindo muito tempo, considerável consumo de solventes orgânicos, além de extrair interferentes indesejáveis da matriz [Vázquez *et al.*, 2008]. Os métodos de extração mais utilizados são baseados na extração líquido-líquido (LLE) [Otero, Grande & Gándar, 2003], extração em fase sólida (SPE) [Stajnbaher & Zupancic-Kraj, 2003] [Liu *et al.*, 2005] [Muccio *et al.*, 2006] [Otero, Grande & Gándara, 2003], extração com fluido supercrítico (SFE) [Dórea, 1999] e por dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) [Silva *et al.*, 2008] [Blasco *et al.*, 2002] [Menezes Filho *et al.*, 2006]. A microextração em fase sólida (SPME) tem emergido como uma alternativa versátil de procedimento de extração e pré-concentração [Lachenmeier *et al.*, 2006]. A SPME integra em um processo ininterrupto a amostragem, a extração, a pré-concentração e a introdução da amostra no sistema de análise [Picó *et al.*, 2007], evitando a contaminação da matriz. Esta técnica é de crescente interesse na análise de resíduos de agrotóxicos, sendo aplicada na determinação de várias classes de agrotóxicos em meio aquoso

ou em outras matrizes [Picó *et al.*, 2007]. A SPME tem sido usada rotineiramente em combinação com a cromatografia gasosa, com diferentes tipos de detectores, em especial acoplada a espectrometria de massas e mais recentemente com a cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos acoplado com a espectrometria de massas [Sagratini *et al.*, 2007].

Os métodos analíticos usando a análise multirresíduos são desenvolvidos para a determinação simultânea de agrotóxicos de diferentes grupos químicos em frutas e vegetais. Entretanto, devido ao fato dos compostos apresentarem diferentes valores de polaridade, solubilidade, volatilidade e pka, torna-se um desafio a otimização simultânea das etapas de extrações e análise [Stajnbaher & Zupancic-Kraj , 2003].

2. Fundamentação teórica

2.1. Agrotóxicos

Através do decreto da Presidência da República 4.074 de 04 de janeiro de 2002 [Brasil, 2002], amparado na lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, definiu-se agrotóxicos e afins como “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, 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-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

O uso dos agrotóxicos é descrito como uma prática utilizada desde a antiguidade, como no uso do piretro de origem natural [Menezes Filho, 2005]. No século XV, outras substâncias tóxicas como arsênico, mercúrio e chumbo, foram incorporadas no combate às pragas. Já no século XVII, o sulfato de nicotina, extraído das folhas de tabaco, também passou a ser adotado no combate de insetos [ANVISA, 2006]. No ano de 1872 o químico Ottmar Zeidler sintetizou, na Universidade de Estrasburgo, a substância diclorodifenil-tricloroetano (DDT). Mais tarde, o químico Paul Müller verificou que esta substância possuía forte ação inseticida. O DDT foi então muito usado em programas de saúde pública, no combate da malária, tifo, febre amarela e outras doenças infecciosas [Dórea, 1999].

Nas primeiras décadas do século XX, o controle de pragas no Brasil era feito com produtos à base de substâncias inorgânicas ou produtos biológicos. A partir da década de 30 do século XX, o aumento da produção agrícola e, principalmente, a diversidade de culturas impuseram a utilização de outras substâncias com melhor poder no combate às pragas [Galli *et al.*, 2006]. Após a Segunda Guerra Mundial os agrotóxicos organossintéticos passaram a dominar o mercado mundial e no Brasil não foi diferente, quando em 1946, a empresa Eletroquímica Fluminense iniciou a fabricação do fungicida hexaclorobenzeno (BHC). Em 1948 a Rhodia passou a produzir no país o inseticida Parathion (Parationa) e em 1950 uma fábrica de armas químicas do exército no Rio de Janeiro começou a fabricar o DDT [Bull & Hathaway, 1986]. A efetiva instalação do parque brasileiro de produção de agrotóxicos foi

impulsionado nos anos 70 com a criação do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas, instrumento utilizado para a correção das distorções entre o aumento do consumo e o fraco desempenho da produção nacional de agrotóxicos.

Segundo o boletim divulgado em dezembro de 2008, pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), referente às vendas de agrotóxicos entre os meses de janeiro e outubro de 2008, a indústria de defensivos agrícolas teve um crescimento expressivo, em comparação com o mesmo período de 2007. Até outubro de 2008, o setor vendeu R\$ 10,24 bilhões em defensivos, 31 % a mais que no mesmo período de 2007. Os herbicidas continuaram sendo o carro-chefe do setor, tanto em vendas totais quanto no incremento de vendas, com um aumento de 35%. Os inseticidas seguiram em segundo lugar, seguidos pelos inseticidas, como se pode ver na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação das vendas de agrotóxicos entre os meses de janeiro e outubro de 2007 e 2008.

Segmentos	Mercado de defensivos: Janeiro – Outubro (Milhões R\$)		
	2007	2008	Aumento (%)
Herbicidas	3.446	4.643	35
Inseticidas	2.244	2.944	31
Fungicidas	1.728	2.173	26
Acaricidas	146	176	21
Outros	257	309	20
Total	7.821	10.246	31

Fonte: SINDAG, 2009.

Segundo estudo da consultoria alemã Kleffmann Group, encomendado pela Associação Nacional de Defesa de Vegetal (Andef), o Brasil é o maior mercado de agrotóxicos do mundo e movimentou no ano de 2008 US\$ 7,1 bilhões, ante US\$ 6,6 bilhões do segundo colocado, os Estados Unidos. Em 2007, a indústria nacional girou US\$ 5,4 bilhões. Apesar do grande volume de recursos movimentados pela indústria no mercado brasileiro, o consumo por hectare ainda é pequeno em relação a outros países. De acordo com o levantamento, o gasto do produtor brasileiro com agrotóxico ainda é pequeno, se comparado a outros países. Em 2007, gastou-se US\$ 87,83 por hectare. Na França, os produtores desembolsaram US\$ 196,79 por hectare, enquanto no Japão a despesa foi de US\$ 851,04 [Estadão, 2009].

Os agrotóxicos podem ser classificados por diferentes critérios. Em relação à sua forma de atuação, podem ser sistêmicos e não sistêmicos. Os sistêmicos são transportados através da

seiva do vegetal em concentração letal ao inseto. Os agrotóxicos não sistêmicos possuem ação de contato (via dérmica), penetração (ação translaminar), ingestão (via oral) e fumigante (via respiratória). Os agrotóxicos sistêmicos possuem a vantagem de serem seletivos atacando a praga alvo e provocando um menor impacto no ambiente. Porém, como o agrotóxico encontra-se no interior do vegetal é necessário respeitar o intervalo de carência para a comercialização do produto, evitando a contaminação do consumidor [Fellenberg, 1980].

Os agrotóxicos são divididos em cinco grupos quanto à classe toxicológica, como se pode observar na Tabela 2. Esta classificação é feita com base nos valores da DL₅₀, que é a dose necessária para causar uma resposta (morte) em 50% de uma população selecionada para determinar o efeito letal [FAO/OMS, 1994].

Para facilitar a correlação entre a toxicidade de um produto comercial e o princípio ativo deste produto a ANVISA, através do decreto nº 4074, de 4 de janeiro de 2002 [Brasil, 2002], classifica os agrotóxicos e estabelece uma correlação entre a sua toxicidade e a cor da embalagem. A Tabela 2 mostra esta correlação.

Tabela 2. Classificação toxicológica dos agrotóxicos (ANVISA, 2005).

Classificação	Classe toxicológica	DL ₅₀ (mg/kg para ratos)	Cor da embalagem
Extremamente tóxico	I	≤ 5,0	Faixa vermelha
Altamente tóxico	II	5,0 – 50,0	Faixa amarela
Medianamente tóxico	III	50,0 – 500,0	Faixa azul
Pouco tóxico	IV	500,0 – 5000,0	Faixa verde
Relativamente tóxico	V	> 5000,0	Faixa verde

Quanto à classe química os agrotóxicos podem ser classificados em cinco grandes grupos: os organoclorados, os inibidores de colinesterase (organofosforados e carbamatos), as piretrinas naturais e sintéticas, derivados de uréia e nitrocompostos [EMBRAPA, 2004]. Compreendem uma larga variedade de substâncias químicas com diferentes grupos funcionais e, conseqüentemente, com diferentes modos de ação, biotransformação e eliminação.

Os agrotóxicos organoclorados são extremamente tóxicos e apresentam elevado tempo de degradação devido a sua estabilidade química. São lipossolúveis e tendem a se acumular ao longo das cadeias alimentares. Esses produtos revelam efeitos cancerígenos em ratos e são

considerados como prováveis agentes cancerígenos para humanos [Gaynor, 2007]. Os inseticidas organoclorados da classe dos DRINS (Aldrin[®], Dieldrin[®], Endrin e Endrin Cetona) foram amplamente utilizados durante as décadas de 50 a 70, em razão da elevada eficiência do seu uso no controle das pragas. Levando-se em consideração o reconhecido potencial inseticida e a menor persistência ambiental dos organofosforados (OPP), os organoclorados foram sendo substituídos pelos organofosforados e posteriormente, em parte, pelos carbamatos [Moraes *et al.*, 2002].

Os agrotóxicos organofosforados são amplamente usados na agricultura como inseticidas em vários cultivares agrícolas, tais como na produção de frutas e vegetais [Lambropoulou & Albanis, 2003]. Possuem em sua estrutura um átomo central de fósforo que é polarizável, de baixa a média eletronegatividade, usualmente tem número de coordenação igual a três, enquanto no estado pentavalente possui três átomos ligados por ligações simples e possui uma ligação dupla com um átomo de oxigênio ou com outros átomos bivalentes. Os compostos de fósforo trivalentes são bons agentes redutores por causa da forte reatividade dos pares de elétrons não ligantes e da facilidade de formação da ligação P=O. Por isso, os compostos fosforados são rapidamente oxidados por oxigênio, ozônio, peróxidos e outros agentes oxidantes. A força da ligação carbono-fósforo é similar à da ligação carbono-carbono e muito resistente para oxidação e hidrólise. As diferentes atividades dos compostos organofosforados estão relacionadas, evidentemente, com características estruturais, tais como o tipo de heteroátomo ou grupo funcional ligado ao átomo de fósforo e o seu estado de oxidação. [Dos Santos *et al.*, 2007]. Possuem um efeito tóxico mais agudo para seres humanos e outros mamíferos, pois são inibidores da enzima acetilcolinesterase, essencial para a regulação da transmissão de impulsos nervosos [Galli *et al.*, 2006].

A enzima acetilcolinesterase é responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina, que é liberado pela chegada de uma considerável concentração iônica ao terminal nervoso, quando um nervo transmite um impulso para outro ponto por meio de variações na concentração dos íons. Ela é responsável pela excitação de células, provocando uma resposta do músculo. Após esta excitação a acetilcolina deve ser removida, pois a sua presença provoca movimentos desordenados do músculo. Em mamíferos, estes efeitos caracterizam-se principalmente por lacrimejamento, salivação, sudorese, diarreia, tremores e distúrbios cardiorrespiratórios. Estes últimos são decorrentes do aumento das secreções brônquicas e de depressão do sistema nervoso central [Caraliere *et al.*, 1996].

A toxicidade dos organofosforados varia em função do tipo de radical alquila ligado ao fósforo e da presença ou não do oxigênio ligado ao átomo de fósforo na molécula. Quando existe a troca da ligação entre o fósforo e enxofre (P=S) para fósforo e oxigênio (P=O), o átomo de fósforo fica mais eletropositivo, possibilitando a este realizar um ataque mais eficaz na molécula da enzima acetilcolinesterase. Assim, esta troca aumenta a toxicidade para insetos e mamíferos. O tipo de radical alquila ligado ao átomo de fósforo também afeta a toxicidade da molécula e sua capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase. Por exemplo, a substituição na parationa do radical metil (parationa metílica, Figura 1) por um radical etil (parationa etílica, Figura 2) aumenta a toxicidade da molécula [Dórea, 1999].

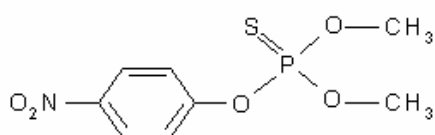


Figura 1. Estrutura da parationa metílica

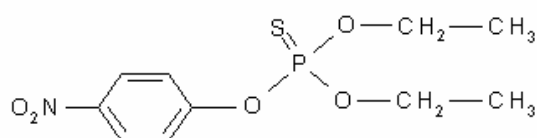


Figura 2. Estrutura da parationa etílica

Os organofosforados são biodegradáveis, sendo curta a sua persistência no solo, variando de 1 a 3 meses. O principal meio de degradação no ambiente ocorre por hidrólise sob condições alcalinas. A maioria dos organofosforados é estável na faixa de pH de 3 a 6.

Os carbamatos são sais ou ésteres derivados do ácido carbâmico (Figura 3) com substituições dos hidrogênios da carboxila e do grupo amina, por outros elementos, grupos funcionais ou radicais. A Figura 4 mostra a fórmula geral dos carbamatos. Também são inibidores da enzima acetilcolinesterase, diferenciando-se dos organofosforados pelo fato de ser um átomo de carbono, e não de fósforo, que ataca a enzima destruidora de acetilcolina. A enzima carbamilada é instável e a regeneração da acetilcolinesterase é relativamente rápida quando comparada com a enzima fosforilada. Assim, os carbamatos são menos perigosos com relação à exposição humana do que os organofosforados. Têm ação rápida e efeitos imediatos, cessando logo após término da exposição. As manifestações são de menor gravidade (leve a moderada), com predomínio de efeitos nos músculos. O diagnóstico é clínico, com início em 30 min e até 1 ou 2 horas após a exposição, com cerca de 6 horas de duração [Barbosa, 2004]

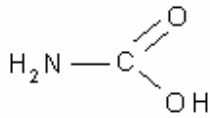


Figura 3. Estrutura do ácido carbâmico

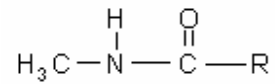


Figura 4. Fórmula geral dos carbamatos

Estes compostos são muito instáveis em condições neutras e alcalinas à temperatura ambiente [Galli *et al.*, 2006]. Eles não são persistentes no meio ambiente e apresentam efeito residual moderado. A meia-vida dos carbamatos no solo é em torno de 9 dias. Os carbamatos são metabolizados por microrganismos ou degradados na água e no solo, especialmente em meio alcalino, com a formação de amônia, aminas, dióxido de carbono, fenol e álcoois [Galli *et al.*, 2006].

Os piretróides são análogos sintéticos das piretrinas. O piretro é obtido a partir das flores de plantas pertencentes ao gênero *Chrysanthemum* (*Pyrethrum*) e espécie *cinerariaefolium*, que possuem as piretrinas como seus componentes ativos. A síntese do ácido crisantêmico (Figura 5) abriu novos caminhos para a obtenção de piretróides.

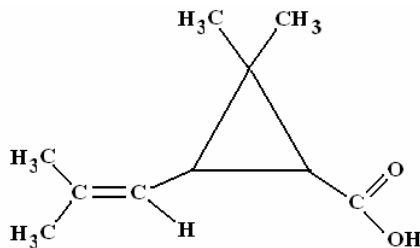


Figura 5. Estrutura química do ácido crisantêmico

Os piretróides foram desenvolvidos com a finalidade de obter compostos com maior potencial inseticida e com menor toxicidade aos mamíferos. Apesar de possuírem uma menor toxicidade que a maioria das outras classes de agrotóxicos, podem apresentar um potencial risco em ambientes fechados, uma vez que são frequentemente utilizados como inseticidas domésticos. Os piretróides são mais eficientes e seguros, pois são seletivos, sendo largamente empregados em diversos tipos de culturas no controle de insetos, podendo ser eventuais contaminantes em alimentos.

Os piretróides têm sido considerados como uma das classes de inseticidas com maior potencial na agricultura devido a sua curta persistência no meio ambiente e alta atividade para

insetos. Destacam-se pela sua utilização na agricultura a bifentrina, cipermetrina, deltametrina, fenpropatina e permetrina [Oviedo, Toledo & Vicente, 2003].

Os piretróides sintéticos têm boa estabilidade sob luz e temperatura ambiente. Degradam-se, toda via por hidrólise e oxidação, sendo caracterizados também pela rápida degradação por microrganismos do ambiente, não se detectando a acumulação de resíduos. São os compostos de ação mais rápida na interferência da transmissão de impulsos nervosos. Possuem alta eficiência, sendo necessárias menores quantidades de produto ativo, resultando em menor contaminação nas aplicações. Com isso, vêm tomando rapidamente o lugar dos organofosforados. Outra vantagem desta classe é que eles admitem a sinergia, aumentando a sua eficácia.

Os benzimidazóis são utilizados na agricultura como fungicidas no controle de organismos patogênicos em tratamentos pré e pós-colheita [Veneziano *et al.*, 2004]. São sistêmicos com ação curativa e protetora, atuando na inibição da mitose e na divisão celular [IUPAC, 2009]. Os fungicidas sistêmicos desse grupo, como tiabendazol, cardendazim, tiofanato metílico e benomil se caracterizam por uma alta seletividade, atuando em poucos processos do metabolismo dos fungos. Entre os benzimidazóis, o primeiro composto desenvolvido foi o tiabendazol (Figura na Tabela 3), introduzido em 1961 como um vermífugo utilizado em medicina humana e veterinária [Silva & Melo, 2009]. A Figura 6 mostra a estrutura do benzimidazol.

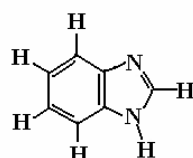


Figura 6. Estrutura do benzimidazol

Os triazóis são compostos heterocíclicos com um anel de cinco membros contendo dois átomos de carbono e três átomos de nitrogênio. A Figura 7 mostra as estruturas básicas dos triazóis. Estes compostos são fungicidas sistêmicos com ação protetora e curativa. Eles inibem a enzima específica, C14-demetilase, que desempenha um papel na produção de esterol, como o ergosterol que é essencial para o desenvolvimento das paredes celulares, resultando no crescimento fúngico anormal, levando a morte. Devido a sua toxicidade, os triazóis têm sido associados a mudanças na funcionalidade do fígado, diminuição do peso do rim, alteração na estrutura da bexiga urinária e efeitos agudos sobre o sistema nervoso central [Zambonin &

Palmisano, 2002]. Os triazóis são solúveis em água e estáveis em pH entre 5 e 9 [IUPAC, 2009].

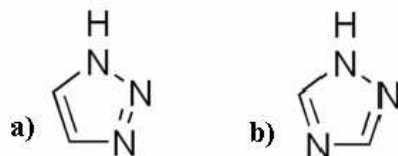


Figura 7. a. Estrutura do 1,2,3-triazol e b. Estrutura do 1,2,4-triazol

As estrobilurinas correspondem a uma nova classe de fungicidas e apresentam um novo modo de ação, que é muito seguro do ponto de vista ambiental. A eficácia das estrobilurinas está associada à inibição da respiração mitocondrial dos fungos. Portanto, trata-se de uma classe de agrotóxicos seletiva. A estrobilurina A é base desta classe de compostos e é um produto natural produzida pelo fungo *Strobilurus tenacellus*. O grupo inclui compostos sintéticos como azoxistrobina (estrutura na Tabela 3), metominostrobrina, trifloxistrobina, picoxistrobina, dimoxistrobina e piraclostrobina (estrutura na Tabela 3) que agem de forma semelhante a estrobilurina A [Viñas *et al.*, 2009]. Estes compostos são solúveis em água e são estáveis, não sofrendo alterações em função de variações no pH [IUPAC, 2009].

As avermectinas são classificadas como biopesticidas [IUPAC, 2009] e são produtos da fermentação de uma cepa de *Streptomyces avermitilis*. As avermectinas possuem potentes atividades inseticida, acaricida e neomacida. A abamectina (estrutura na Tabela 3), ivermectina e doramectina são exemplos de agrotóxicos desta classe, que apresentam boa popularidade entre agricultores e veterinários, devido ao seu amplo espectro de atividade [Kolar *et al.*, 2008]. Apresentam ação de contato e de ingestão com atividade sistêmica limitada, bloqueiam a atividade elétrica dos nervos e músculos das pragas. Estes compostos são pouco solúveis em água e são estáveis no meio aquoso em pH entre 5 e 7. [IUPAC, 2009].

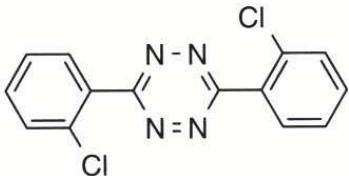
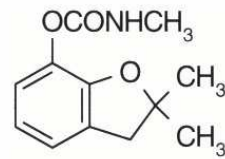

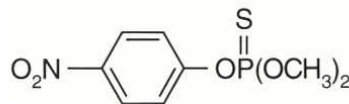
As tetrazinas são compostos heterocíclicos com seis membros contendo dois átomos de carbono e quatro átomos de nitrogênio. A Figura 8 mostra as estruturas das tetrazinas. São utilizados como acaricidas e são específicos com ação de contato, apresentando longa atividade residual. São pouco solúveis em água e sofrem degradação em meio alcalino (pH 9) [IUPAC, 2009]. Entre as tetrazinas mais utilizadas está a clofentezina (estrutura na Tabela 3).



Figura 8. a. Estrutura da 1,2,3,4-tetrazina e b. Estrutura da 1,2,4,5-tetrazina.

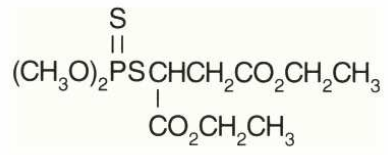
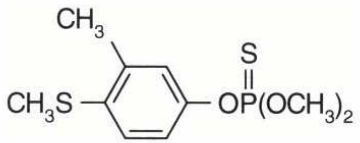
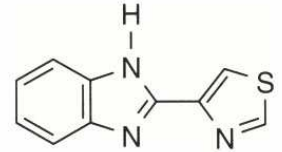
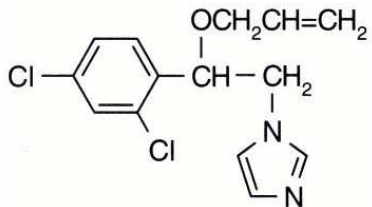
A Tabela 3 mostra a estrutura química, grupo químico, fórmula molecular, massa molar, log do coeficiente de partição octanol/água, solubilidade em água, temperatura de fusão, pressão de vapor e pKa dos compostos selecionados para esse estudo.

Tabela 3. Estrutura química, grupo químico e características físico-químicas dos compostos estudados.

Composto	Grupo químico	Fórmula	MM	Log (k_{ow}) (20°C)	Sol. água (mg L ⁻¹) 20°C	T _(Fusão) (°C)	Pressão de vapor (mPa, 25°C)	pka
<p>Clofentezina</p> 	Tetrazina	C ₁₄ H ₈ Cl ₂ N ₄	303,1	3,10	0,002	183,0	1,4 · 10 ⁻³	-
<p>Carbofuran</p> 	metilcarbamato	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221,3	1,70	319	153,1	8,0 · 10 ⁻²	-
<p>Diazinona</p> 	Organofosforado	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	304,3	3,69	60,0	Liq.	11,97	2,6 ácido forte
<p>Parationa metílica</p> 	Organofosforado	C ₈ H ₁₀ NO ₅ PS	263,2	3,00	55,0	35,5	0,2	-

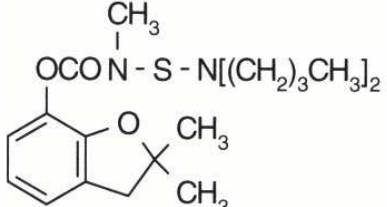
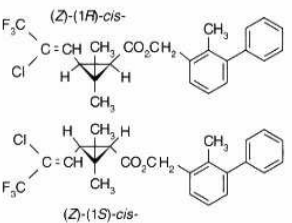
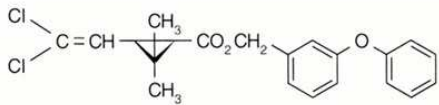
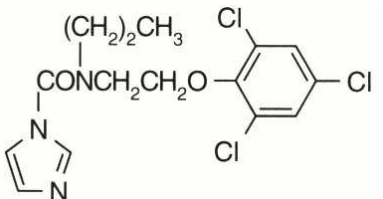
Fonte: IUPAC, 2008.

Tabela 3 (Continuação).

Composto	Grupo químico	Fórmula	MM	Log (k_{ow}) (20°C)	Sol. água (mg L ⁻¹) 20°C	T _(Fusão) (°C)	Pressão de vapor (mPa, 25°C)	pka
Malationa 	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	330,3	2,75	145,0	-20,0	3,1	-
Fentiona 	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	278,3	4,84	4,2	7,5	0,37	-
Tiabendazole 	benzimidazol	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	201,2	2,39	30,0	297,0	5,3 · 10 ⁻⁴	4,73 base fraca
Imazalil 	imidazol	C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O	297,2	2,56	142,0	48,6	0,158	6,53 base fraca

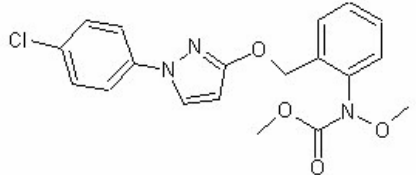
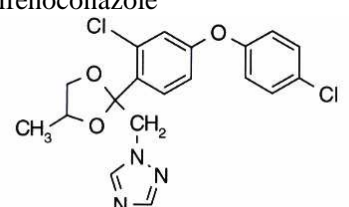
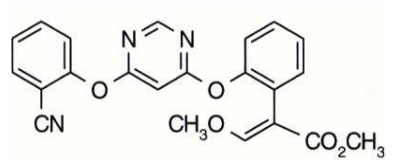
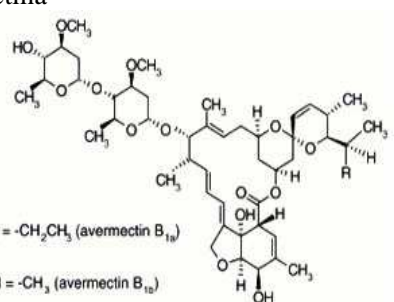
Fonte: IUPAC, 2008.

Tabela 3 (Continuação).

Composto	Grupo químico	Fórmula	MM	Log (k_{ow}) (20°C)	Sol. água (mg L ⁻¹) 20°C	T _(Fusão) (°C)	Pressão de vapor (mPa, 25°C)	pKa
Carbosulfan 	metilcarbamato	C ₂₀ H ₃₂ N ₂ O ₃ S	380,5	7,42	0,11	Liq.	3,6 · 10 ⁻²	-
Bifentrina 	Piretróide	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂	422,8	7,30	0,001	69,3	1,8 · 10 ⁻² (20°C)	-
Permetrina 	Piretróide	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	391,3	6,10	0,2	34,5	2,0 · 10 ⁻³	-
Procloraz 	Imidazolcarboxi-amida	C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂	376,7	3,53	34,4	48,3	0,15	3,8 base fraca

Fonte: IUPAC, 2008.

Tabela 3 (Continuação).

Composto	Grupo químico	Fórmula	MM	Log (k_{ow}) (20°C)	Sol. água (mg L ⁻¹) 20°C	T _(Fusão) (°C)	Pressão de vapor (mPa, 25°C)	pka
Piraclostrobina 	estrobilurina	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	387,8	3,99	1,9	64,5	2,6 · 10 ⁻⁵	-
Difenoconazole 	triazol	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	406,2	4,20	15,0	82,5	3,3 · 10 ⁻⁵	-
Azoxistrobina 	estrobilurina	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403,4	2,50	6,7	116,0	1,1 · 10 ⁻⁷	-
Abamectina  <p>(i) R = -CH₂CH₃ (avermectin B_{1a}) (ii) R = -CH₃ (avermectin B_{1b})</p>	Avermectina	C ₄₈ H ₇₂ O ₁₄ + C ₄₇ H ₇₀ O ₁₄	866,6	4,4	1,21	165,6	3,7 · 10 ⁻³ (20°C)	-

Fonte: IUPAC, 2008.

2.2. Produção de manga

A fruticultura é um importante setor que contribui para o crescimento da economia brasileira, sendo uma grande geradora de empregos e de divisas. Com uma produção de aproximadamente 40 milhões de toneladas anuais e uma área plantada aproximadamente de 2,5 milhões de hectares, o Brasil ocupa a terceira posição no ranking mundial dos maiores produtores de frutas, atrás apenas da Índia e da China [Embrapa (a), 2009]. As frutas são produzidas em todas as regiões do Brasil com predominância das regiões Nordeste e Sudeste. A região Nordeste é a primeira na produção de banana, coco, cacau, caju, mamão, manga, abacaxi, melão e maracujá. Nos últimos anos o setor tem registrado importantes conquistas, como a abertura de novos mercados para o escoamento da produção nacional de frutas. Para tanto, foi necessário superar as barreiras fitossanitárias e tarifárias impostas pelos principais mercados importadores. Para ampliar estas conquistas será necessário ampliar a infra-estrutura de transporte, armazenamento e de análise de resíduos de agrotóxicos, bem como estabelecer uma legislação de segurança alimentar aceita pelos principais países importadores, em relação a frutas frescas e processadas [Embrapa (a), 2009].

A manga (*Mangifera indica* L.) pertence à família *Anacardiaceae* e figura entre as frutas tropicais de maior expressão econômica nos mercados brasileiro e internacional [Silva *et al.*, 2005]. É uma fruta originária da Ásia (Índia) e foi trazida ao Brasil pelos portugueses, tornando-se uma das principais frutíferas cultivadas no Nordeste brasileiro. É uma fruta de polpa firme, com sabor, aroma e cor muito agradáveis, fazendo parte do elenco das frutas tropicais de importância econômica não só pela aparência exótica, mas também por ser uma fonte rica em carotenóides, minerais e carboidratos [Brandão *et al.*, 2003]. Apresentando grandes possibilidades de industrialização, ainda não devidamente exploradas, sua comercialização consiste quase que exclusivamente no fruto *in natura*, embora possa ser transformada em diferentes produtos tais como sucos, néctares, geléias, compotas, sorvetes e outros. Devido a sua sazonalidade, torna viável sua industrialização, visando um melhor aproveitamento, diminuição das perdas de produção e aumento do valor agregado aos produtos obtidos [Brunini *et al.*, 2002].

Por se tratar de uma cultura lucrativa e de boa aceitação, tanto no mercado interno como no externo, é crescente o interesse por esta cultura com destaque para as regiões com projetos de fruticultura irrigada. Segundo dados do Ministério da Agricultura, a produção de

manga teve um aumento significativo entre os anos de 1900 e 2007, como se pode observar na Figura 9.

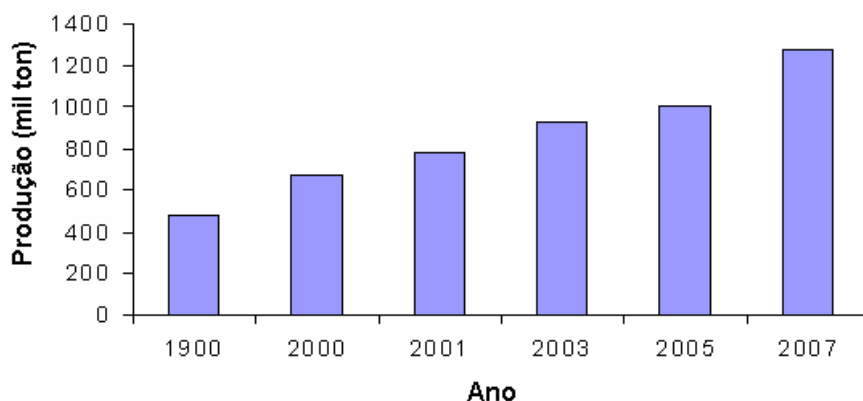


Figura 9. Evolução da produção de manga entre os anos de 1900 e 2007.
Fonte: Ministério da Agricultura, 2009.

Em 2007 o setor de fruticultura foi responsável por 5,7 % das exportações do agronegócio brasileiro com um montante de US\$ 644 milhões. Deste montante, a manga contribuiu com uma soma de US\$ 89,6 milhões, que correspondeu a 13,9 % das exportações do setor neste período. A Figura 10 mostra as porcentagens em valores das principais frutas frescas exportadas pelo Brasil no ano de 2007.

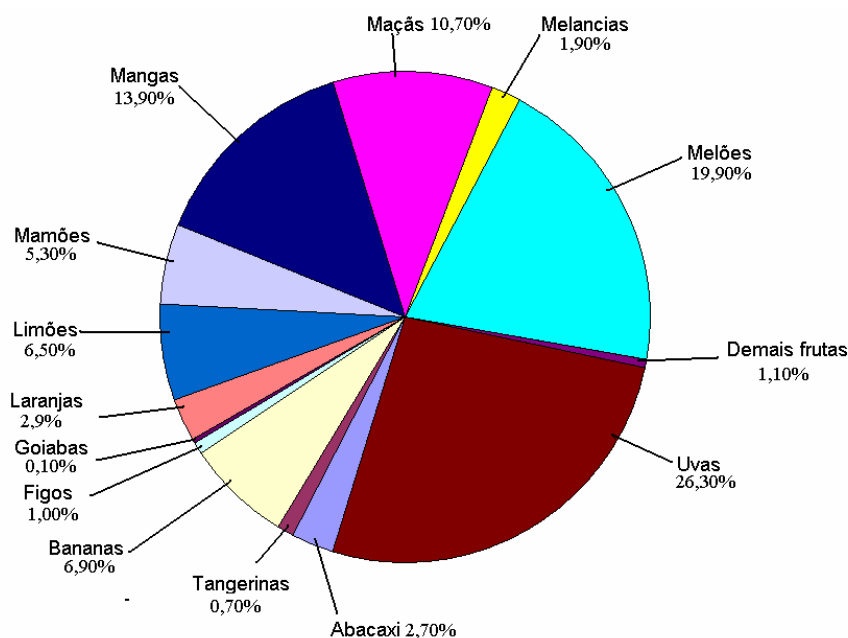


Figura 10. Principais frutas frescas exportadas pelo Brasil em 2007.
Fonte: Ministério da Agricultura, 2009.

A manga é a sétima cultura no ranking nacional de produção de frutas, ficando atrás da produção de laranja, banana, abacaxi, melancia, coco, mamão e uva. Esta cultura apresentou um crescimento nas exportações entre os anos de 2007 e 2008 passando de 116 para 133 mil ton de frutos exportados atingindo uma receita de US\$ 118,7 milhões no ano de 2008 [Brasil, Ministério da agricultura, 2009].

A região Nordeste destaca-se na produção desta fruta sendo responsável por 76,3 % da produção nacional, com destaque para a região do Vale do São Francisco com o pólo de fruticultura irrigada que abrange as cidades de Juazeiro na Bahia e Petrolina em Pernambuco, sendo o Estado da Bahia responsável por 49,9% da produção nacional com uma área cultivada de 30.420 ha, seguido dos Estados de São Paulo e Pernambuco com 13.843 e 9.963 ha, respectivamente [Ibraf, 2009].

A composição química da manga varia com as condições da cultura, variedade, estágio de maturação e outros fatores, sendo constituída principalmente de água, carboidratos, ácidos orgânicos, sais minerais, proteínas, vitaminas, pigmentos, além de outros compostos. O valor vitamínico das mangas fica circunscrito principalmente em torno de seu conteúdo de vitamina A (carotenóides), vitamina C (ácido ascórbico), e pequenas quantidades de vitaminas do complexo B. A manga madura possui quantidade apreciável de vitamina C, chegando a conter 110 mg/100 gramas do fruto conforme a variedade [Silva *et al.*, 2005].

A mangueira se adaptou bem à região Nordeste devido a suas exigências de luminosidade e umidade para o seu desenvolvimento. É uma planta muito resistente à seca devido ao seu sistema radicular que é capaz de atingir grandes profundidades. A radiação solar absorvida pela mangueira interfere no seu ciclo vegetativo e no período de desenvolvimento do fruto, sendo de grande importância para o crescimento, floração e frutificação. A radiação solar incidente promove maiores teores de açúcar e de ácido ascórbico nos frutos. A região do Vale do Rio São Francisco destaca-se na produção de mangas por apresentar temperaturas diurnas/noturnas variando entre 30 e 25°C, que estimulam o crescimento vegetativo e temperaturas entre 28 e 18°C, que promovem uma intensa floração nos meses de maio a agosto. A umidade do ar durante o ciclo da cultura da mangueira é muito importante, por favorecer o surgimento de doenças fúngicas. A maior incidência dessas doenças está associada a elevadas temperaturas, que promovem altos valores de umidade relativa, provocando danos econômicos, podendo, inclusive, inviabilizar a produção comercial de frutos [Embrapa Semi-árido, 2004].

A mangueira enxertada e bem conduzida inicia sua produção no 3º ano pós-plantio, com produção econômica no 4º ano. No Nordeste, a colheita ocorre normalmente, entre outubro e fevereiro e entre agosto e outubro para plantas induzidas, sendo a produtividade na região da ordem de 20 e 30 ton/ha/ano [SEAGRI, 2009].

Durante o desenvolvimento a mangueira é atacada por diversas pragas, que provocam a redução na produtividade e diminuição no valor de comércio dos frutos, podendo causar a morte da planta a depender do grau de infestação do pomar. A mosca-das-frutas (*Anastrepha* sp., *Ceratitis capitata*. *Díptera*. *Tephritidae*), a cochonilha (*Aulacaspis tubercularis*) e o ácaro (*Eriophyes mangiferae*, *Eriophyidae*) são as pragas que causam maiores prejuízos a esta cultura. O tratamento fitossanitário destas pragas é feito à base de agrotóxicos organofosforados como malationa, parationa metílica, diazinon, fentiona e triclorfon [SEAGRI, 2009]. Entretanto, é importante ressaltar que a fentiona e o triclorfon são os únicos agrotóxicos organofosforados autorizados pela ANVISA para esta cultura [ANVISA, 2009].

Durante o ciclo de produção, podem aparecer diferentes doenças fúngicas que afetam a produtividade e provocam danos aos pomares. A seca-da-mangueira provocada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* é a doença mais grave que afeta a árvore podendo causar sua morte em pouco tempo. A antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioies* causa grandes prejuízos econômicos por provocar lesões irregulares nos frutos. O oídio é uma doença proveniente do fungo *Oidium mangiferae* e provoca a queda dos ramos novos, flores e frutos. O controle fitossanitário destas doenças é feito com fungicidas sintéticos como o imazalil, difenoconazol, benomil e fungicidas cúpricos [SEAGRI, 2009].

Várias doenças acometem a manga na pós-colheita, provocando perdas expressivas. Entre essas, a antracnose é a mais expressiva. No Brasil, o controle da antracnose e de outras doenças da manga em pós-colheita pode ser feito pela imersão dos frutos durante 5 minutos em água, a 55 °C, acrescida de tiabendazol ou benomil a 0,2 % [Junqueira *et al.*, 2004]. Embora eficazes no controle da doença, esses fungicidas podem deixar resíduos nos frutos, o que não agrada aos consumidores que, a cada dia, vêm aumentando suas exigências por frutas frescas sem resíduos de agrotóxicos. Segundo Junqueira *et al.* (2004) a antracnose da manga Tommy Atkins na pós-colheita, pode ser controlada com um procedimento alternativo livre de agrotóxicos e que apresenta eficácia igual ou superior ao tiabendazol. Este procedimento é realizado por imersão dos frutos em caldas contendo extratos etanólicos de sucupira branca (*Pterodon pubescens*) a 40 °C.

Para os próximos anos as perspectivas para a cultura da manga, tendo em vista os mercados nacional e internacional, são favoráveis. Considerando que no Brasil a produção integrada de frutas tem aumentado e que os consumidores buscam um padrão de alimentação mais saudável.

2.3. Técnicas para amostragem e análise de resíduos de agrotóxicos em frutas.

O preparo da amostra é uma etapa essencial para a análise cromatográfica de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais. Esta etapa é importante para a remoção de interferentes e concentração dos analitos, tendo em vista que, as concentrações do analito são geralmente muito baixas e as amostras são complexas. Os métodos tradicionais de preparo de amostras baseados na extração líquido-líquido (LLE), extração Soxhlet e mais recentemente na extração em fase sólida (SPE), são trabalhosos, consomem muito tempo e grandes volume de solventes orgânicos, elevando o custo das análises e gerando resíduos, com riscos de contaminação da amostra e do ambiente. Novas tendências na química analítica têm levado à simplificação e crescente automação de etapas analíticas preliminares, particularmente em consideração à etapa de extração [Sánchez-Ortega *et al.*, 2005]. É crescente o interesse por procedimentos de preparo de amostras que sejam rápidos, exatos, precisos, livres de solventes, econômico e de fácil automação [Beyer & Biziuk, 2008].

Metodologias baseadas na dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) [Sobrinho & Dórea, 2004] [Menezes Filho *et al.*, 2006] [Silva *et al.*, 2008], microextração em fase líquida (LPME) [Lambropoulou & Albanis, 2007] e na microextração em fase sólida (SPME) [Chai & Tan, 2009] são mais rápidas, fazem uso de pequeno volume de solvente orgânico ou não utilizam solvente com conseqüente redução de custo. Entre estas técnicas a SPME é a de mais fácil automatização e pode ser considerada como uma ferramenta adequada para a amostragem automática e tratamento de amostras, caracterizando-se como uma grande vantagem desta técnica em comparação às técnicas tradicionais [Farajzaden & Hatami, 2004]. A microextração em fase sólida integra em um único passo as etapas de amostragem, extração e concentração [Huang *et al.*, 2004].

2.4. Microextração em Fase Sólida (SPME)

2.4.1. Histórico da SPME e aplicações

A microextração em fase sólida é considerada como uma microtécnica de extração e de pré-concentração de analitos, pois esses processos são realizados em escala muito pequena. A técnica foi desenvolvida entre 1989 e 1990 pelo Prof. Janusz Pawliszyn [Arthur & Pawliszyn, 1990] e colaboradores na Universidade de Waterloo, em Ontário, Canadá, para uso em combinação com a cromatografia a gás, na análise de poluentes orgânicos voláteis e semivoláteis em amostras de água [Quinteiro *et al.*, 2003]. Pawliszyn e colaboradores utilizaram uma seringa contendo no interior da agulha uma fibra de sílica, recoberta por uma fase estacionária orgânica. O pequeno tamanho da fibra e sua forma geométrica cilíndrica permitiram incorporá-la a esta seringa. Desta forma a sua manipulação é facilitada e permite proteger a fibra quando a mesma não está sendo utilizada [Zhan *et al.*, 1994]. No desenvolvimento da técnica, Pawliszyn, após estudar as diferentes variáveis que influenciam no processo de extração, concluiu que esta técnica de extração não é exaustiva, mas sim, que envolve um equilíbrio entre a fase que contém os analitos e a fase orgânica estacionária. Este fato leva alguns pesquisadores e agências reguladoras de agentes tóxicos a fazerem ressalvas à técnica, considerando-a como semi-quantitativa em vez de quantitativa.

A SPME é uma técnica relativamente simples e a sua execução envolve uma etapa de extração, seguida da dessorção. A etapa de extração baseia-se na sorção dos analitos por uma fibra de sílica modificada quimicamente. Isso ocorre quando a fibra é exposta aos analitos, devido à migração dos mesmos da amostra para a fase de recobrimento na fibra até que se alcance a situação de equilíbrio (Figura 11). O processo de extração pode ocorrer por adsorção ou por absorção em função do tipo de fibra utilizada [Aumatell, 2005]. Para executar a extração por SPME, deve-se colocar um volume da amostra em um frasco de vidro hermeticamente fechado com septo (silicone ou teflon). Em seguida se perfura o septo e se introduz a seringa no frasco de vidro. Empurrando o êmbolo para baixo se expõe à fibra na amostra por um tempo previamente estabelecido. Uma vez finalizado o tempo de extração, recolhe-se a fibra para o interior da seringa.

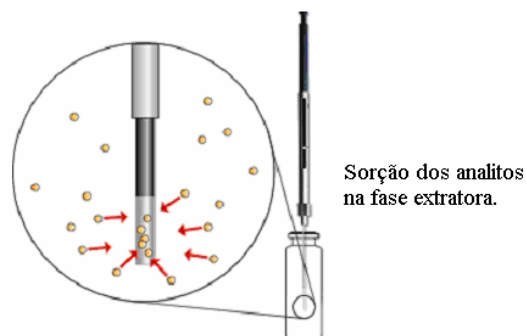


Figura 11. Etapa de sorção dos analitos na fase quimicamente ligada à fibra.

A microextração em fase sólida pode ser realizada por dois diferentes modos de operação. A extração direta (Figura 12) e a extração via *headspace* (Figura 13). A escolha deve ser feita em função, principalmente, do estado físico da matriz, da afinidade do analito pela matriz e de sua volatilidade. Na extração direta, a fibra é colocada diretamente em contato com a amostra (líquida ou gasosa) e os analitos (voláteis ou não) são transportados para a fase extratora. No modo *headspace*, a fibra revestida é inserida no espaço acima da amostra (sólida ou líquida) contida em frasco selado para que ocorra a extração de analitos voláteis ou semivoláteis [Magdic *et al.*, 1996]. Neste caso, como a fibra não entra em contato com a amostra diretamente, o modo *headspace* representa uma alternativa para extrações em amostras sólidas, permitindo também modificações na matriz, tais como mudança no pH e na força iônica, sem prejudicar a fase extratora [Eisert & Levsen, 1996]. Em amostras sólidas ou semi-sólidas a extração de compostos voláteis ou semivoláteis é feita via *headspace*. Porém, para a extração de compostos mais pesados, quando possível deve-se adicionar solvente, para obter um sistema com condições apropriadas para a extração por imersão direta. Quando o analito apresenta grande afinidade pela matriz, é necessário alterar as condições do meio para que os mesmos sejam liberados da matriz e passem a interagir com a fase extratora. Tais modificações envolvem mudança na temperatura do sistema e alteração na força iônica, com variação de pH e adição de sal. Os compostos voláteis e semivoláteis são facilmente extraídos via *headspace*, independentemente do estado físico da matriz. Para compostos de maior massa molecular e menor pressão de vapor a extração por imersão direta é mais apropriada, mas existem limitações quando se trata de matrizes sólidas [Medeiros, 2008].

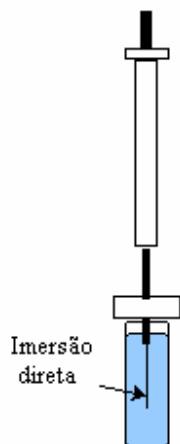


Figura 12. Extração por SPME com imersão direta

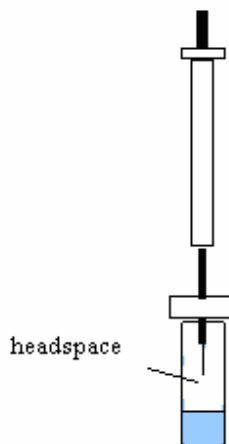


Figura 13. Extração por SPME com *headspace*

A extração direta em amostras de extratos de frutas pode ser difícil, devido à presença de interferentes, que podem ser provenientes de matéria em suspensão, bem como de matéria dissolvida no extrato, em particular as pectinas. Estes fatores são os maiores responsáveis pela redução na eficiência da extração, devido à formação de micelas, retendo os analitos e/ou reduzindo o espaço livre na fibra. Uma sugestão para solucionar este problema é diluir o extrato com adição de água. Porém, a sensibilidade decresce muito, dificultando a determinação dos analitos em baixas concentrações [Simplício & Vilas Boas, 1999]. Outra opção é fazer uma avaliação prévia com uma extração simples e rápida, utilizando uma pequena quantidade de solvente orgânico, seguida da extração por SPME. Com este procedimento a sensibilidade não é reduzida drasticamente e facilita a limpeza do extrato, reduzindo a quantidade de muitos interferentes provenientes da matriz [Cortés-Aguado *et al.*, 2008].

Na etapa de dessorção os analitos são liberados da fibra para o sistema cromatográfico. Esta etapa pode ser por dessorção térmica ou por eluição com um solvente orgânico.

Inicialmente a microextração em fase sólida foi desenvolvida para ser utilizada com a cromatografia gasosa. Assim, a fibra com os analitos é inserida no injetor aquecido de um cromatógrafo a gás e os analitos são termicamente dessorvidos. O injetor do cromatógrafo deve estar aquecido a uma temperatura suficientemente elevada para garantir que ao se expor a fibra, ocorra a dessorção instantânea dos analitos para serem carreados para a coluna cromatográfica (Figura 14). Este é o modo de dessorção mais utilizado e descrito na literatura

[Berrada *et al.*, 2004]. A eficiência da dessorção depende da volatilidade dos analitos, da posição da fibra no injetor, da temperatura do injetor e do tempo de exposição. À medida que se aumenta a temperatura, os coeficientes de partição fibra/gás de arraste, diminuem e, assim, diminui rapidamente a capacidade da fibra de reter os analitos. O fluxo constante de gás de arraste no injetor do cromatógrafo facilita a liberação e o transporte dos analitos. Entretanto, este procedimento cria problemas práticos, tais como a progressiva degradação do polímero e, além disso, no caso da presença de compostos não voláteis, estes não serem completamente dessorvidos da fibra.

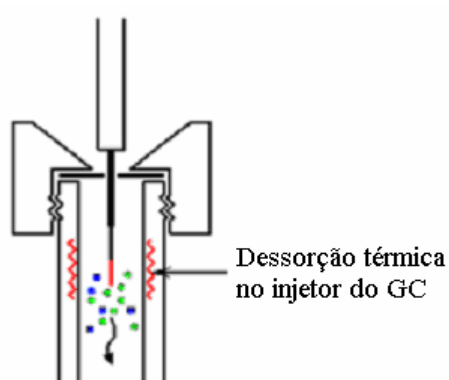


Figura 14. Etapa de dessorção térmica dos analitos no injetor do cromatógrafo a gás.

Uma alternativa proposta para isto é a dessorção com solvente em um sistema acoplado SPME/HPLC. Este modo de dessorção é apropriado para compostos que são termicamente instáveis ou pouco voláteis. A combinação da SPME com a cromatografia líquida (HPLC) utiliza uma interface que permite a realização da dessorção com a própria fase móvel ou introduzindo um solvente orgânico adequado na câmara (Figura 15). O acoplamento SPME-HPLC requer uma interface apropriada, tal como a apresentada na Figura 16, onde a fibra é inserida na extremidade superior e as demais extremidades, lateral e inferior, são conectadas a uma válvula de seis pórticos do HPLC.

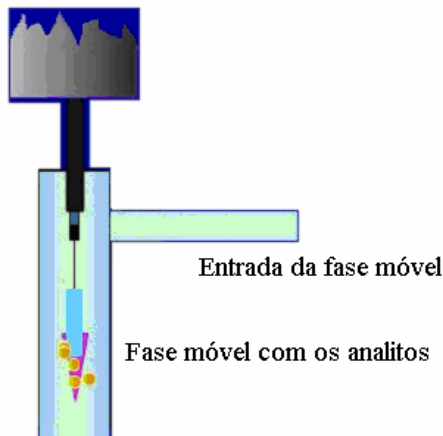


Figura 15. Etapa de dessorção dos analitos na cromatografia líquida

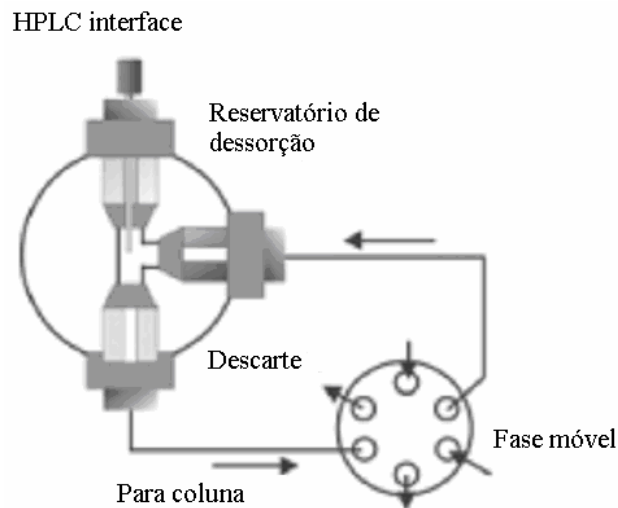


Figura 16. Interface para o acoplamento SPME-HPLC

A dessorção dos analitos para análise em cromatografia líquida pode ser no modo estático, com o uso de um solvente orgânico, ou no modo dinâmico com o uso da própria fase móvel [Sánchez-Ortega *et al.*, 2005]. Na dessorção estática, a fibra permanece na interface, em contato com um volume previamente estabelecido de fase móvel ou de solvente orgânico, durante um intervalo de tempo previamente ajustado, para a dessorção dos analitos [Queiroz & Lanças, 2005]. Na dessorção dinâmica, a fibra permanece na interface, por onde passa a fase móvel, durante um intervalo de tempo previamente otimizado ou durante toda a corrida para garantir a completa dessorção dos analitos.

As análises realizadas por SPME-HPLC apresentam algumas limitações, tais como dificuldades no acoplamento da interface/HPLC, dessorção não eficiente dos compostos sorvidos pela fibra, análise manual, número limitado de fibras adequadas e baixa estabilidade destas fibras, quando expostas à fase móvel ou a solventes orgânicos [Queiroz & Lanças, 2005].

Recentemente, várias aplicações de SPME acoplada a HPLC têm sido descritas na literatura. A vantagem no uso do acoplamento SPME-HPLC é que compostos com baixa volatilidade ou que são termicamente instáveis podem ser analisados. No desenvolvimento de uma metodologia analítica que utilize o acoplamento SPME-HPLC, para uma maior eficiência na extração devem ser avaliados o tipo de fibra, o procedimento de dessorção, a temperatura, pH, a força eluotrópica dos solventes e a força iônica. Uma etapa importante que deve ser avaliada no desenvolvimento da metodologia é o efeito da matriz sobre a eficiência de extração (Huang *et al.*, 2004).

As fibras utilizadas na microextração em fase sólida começaram a ser comercializadas pela Supelco em 1993. Inicialmente, os materiais utilizados como fases extratoras eram o polidimetilsiloxano (PDMS) e o poliacrilato (PA) classificados como apolar e polar, respectivamente. A fase estacionária pode ser constituída por um ou mais tipos de polímeros sorventes [Mestres *et al.*, 1998]. Atualmente, além das fases extratoras mencionadas, também são comercializadas a fase constituída de um copolímero PDMS-divinilbenzeno, Carbowax (CW) (polietilenoglicol), Carbowax-divinilbenzeno, Carboxen (carbono com resinas poliméricas adsorvidas) e Carboxen-PDMS [Huang *et al.*, 2004]. A espessura do revestimento e sua natureza (polar, apolar ou bipolar) são as principais características que governam a seletividade e a eficiência da extração. Tais características são encontradas na literatura e em notas técnicas dos fabricantes. Normalmente, os revestimentos com grande afinidade pelo analito (alta seletividade) e mais espessos (extraem em maior quantidade) proporcionam ao método alta sensibilidade [Potter & Pawliszyn, 1992].

A Tabela 4 mostra as características (revestimento e espessura, polaridade da fase extratora e aplicações sugeridas) de algumas fibras disponíveis comercialmente.

A agitação, no momento da amostragem por SPME, é na maioria das vezes necessária para facilitar o transporte dos analitos para a fase estacionária extratora e assim reduzir o tempo de equilíbrio. Entretanto, a extração sem agitação pode ainda proporcionar bons

resultados, quando os analitos são voláteis e extraídos no modo *headspace* [Valente & Augusto, 2000].

Tabela 4. Características de fibras para SPME disponíveis comercialmente.

Revestimento e espessura (μm)	Polaridade	Aplicações sugeridas
PDMS 7	Não polar	Substâncias apolares de alta massa molecular
PDMS 30		Substâncias semivoláteis não polares
PDMS 100		Substâncias voláteis
PA 85	Polar	Substâncias semivoláteis polares
CW/TR 50		Substâncias surfactantes
CW/DVB 65		Álcoois e compostos polares
CW/DVB 70		Álcoois e compostos polares
Carboxen/DVB 50/30		Flavorizantes (voláteis e semivoláteis)
PDMS/DVB 60	Bi-polar	Aminas e compostos polares
PDMS/DVB 65		Voláteis, aminas e nitroaromáticos
Carboxen/PDMS 75		Gases e compostos de baixa massa molecular
Carboxen/PDMS 85		Gases e compostos de baixa massa molecular

Fonte: Adaptado de Quinteiro *et al.*, 2003.

A SPME apresenta como vantagens a grande simplicidade; baixo custo; utilização de pequenos volumes da amostra; redução significativa do uso de solventes orgânicos; possibilidade de concentração de compostos voláteis e semivoláteis; possibilidade de obter limites de detecção muito baixos (na ordem de ppt) e possibilidades de aplicação a uma grande variedade de amostras, gasosas [Yassaa, *et al.*, 2005; Kleeberg, *et al.*, 2005], líquidas [Cabrera, *et al.*, 2008; Wang, *et al.*, 2009; Cortés-Aguado, *et al.*, 2008; Vázquez, *et al.*, 2008; Riu-Aumatell, *et al.*, 2004; Bonino, *et al.*, 2003; Reto, *et al.*, 2006; Fernandez-Alvarez *et al.*, 2008; Viñas *et al.*, 2008] e sólidas [Fytianos, *et al.*, 2006; Flores, *et al.*, 2006; Simplicio, *et al.*, 1999; Chai, *et al.*, 2009; Wang, *et al.*, 2009; Basheer *et al.*, 2009].

Como toda técnica de extração, a SPME também apresenta limitações, tais como a limitada capacidade de sorção das fibras, devido à quantidade da fase de recobrimento ser muito pequena; a presença de matéria suspensão na amostra poder causar danos ao

recobrimento da fibra durante a agitação; compostos de elevada massa molecular fixarem-se irreversivelmente na fibra modificando as suas propriedades físico-químicas [Alpendurada, 2000] e a formação de bolhas de gás na superfície da fibra podendo afetar a taxa de transferência de massa, podendo aparecer problemas de sensibilidade e precisão.

2.4.2. Otimização do procedimento SPME

Durante o desenvolvimento de um método por SPME, é necessário o estudo e a otimização de um conjunto de variáveis experimentais que influem sobre o equilíbrio na extração. Estas variáveis podem ser modificadas com o objetivo de aumentar a eficiência do processo de extração. Entre os principais fatores experimentais que afetam a eficiência de extração, pode-se destacar:

2.4.2.1. Tipo de fibra sorvente

Os materiais mais utilizados em SPME são o polidimetilsiloxano (PDMS), o poliacrilato (PA), o polidimetilsiloxano/divinil benzeno (PDMS/DVB), o Carbowax (CW), o Carbowax/divinil benzeno (CW/DVB) e Carboxen/polidimetilsiloxano (Carboxen/PDMS). As fases mais empregadas em SPME são o PDMS e o PA, com diferentes espessuras de filmes, dependendo principalmente da polaridade do analito a ser extraído. O PDMS é uma fase não seletiva e bastante apolar, o que dificulta a extração de compostos polares ou quando é desejada seletividade na extração. Materiais mais polares como PDMS/DVB, Carboxen/PDMS e Carbowax/PDMS apresentam maior afinidade com analitos polares como álcoois, fenóis e aminas. Todas as fases são compatíveis com a análise por cromatografia gasosa e algumas demonstram também boa compatibilidade com a cromatografia líquida, enquanto outras não se mostram compatíveis em razão da menor estabilidade em solventes orgânicos, usados na etapa de dessorção. A espessura do filme da fase sólida determina a capacidade da fibra em extrair os analitos, ou seja, a quantidade de analito que pode ser extraída e o tempo de extração. Filmes de maior espessura apresentam maior capacidade de extração, mas requerem maior tempo para atingir o equilíbrio no momento da extração, aumentando assim o tempo de extração [Lanças, 2004].

O conhecimento prévio das características químicas dos analitos é fundamental para a escolha do tipo de recobrimento da fibra. Porém, quanto se trata de uma extração envolvendo um conjunto de compostos pertencentes a diferentes grupos químicos, é necessário verificar experimentalmente qual o tipo de recobrimento que será, em média, o mais eficiente na extração.

2.4.2.2. Efeito da temperatura de extração

Como já dito, a SPME é uma técnica que baseia-se no equilíbrio do analito entre a fase extratora e a matriz. A temperatura é uma variável que influi no sistema em equilíbrio, pois o aumento da temperatura provoca um aumento na velocidade da extração e a redução do tempo necessário para se atingir o equilíbrio, reduzindo também o tempo de extração.

Quando a SPME é realizada por imersão direta, os coeficientes de difusão dos analitos na matriz aumentam com o incremento da temperatura, proporcionando uma maior quantidade de analito extraída. No modo *headspace* o incremento da temperatura aumenta a concentração dos analitos na fase vapor, tornando a extração mais rápida. Porém, o aumento de temperatura pode atingir limites que prejudicam a extração, pois temperaturas superiores podem provocar a dessorção dos analitos retidos na fase extratora (Lanças, 2004), devido a uma diminuição nos coeficientes de partição do analito entre o *headspace* e a fibra, diminuindo assim a quantidade de analito extraída [Pawliszyn, 1997].

Na extração simultânea de um grupo de analitos com diferentes grupos químicos, é necessário avaliar experimentalmente a temperatura ideal de trabalho, pois o aumento da temperatura favorece a extração dos compostos menos voláteis, mas poderá diminuir a eficiência na extração dos compostos mais voláteis ou dos compostos que apresentam menor afinidade com a fase extratora.

2.4.2.3. Efeito do tempo de extração

O tempo de extração corresponde ao tempo de contato entre a fase extratora e a fase extraída para que os analitos sejam sorvidos pela fibra revestida [Quinteiro *et al.*, 2003]. O estado de equilíbrio é alcançado a partir do momento que a quantidade de analito extraída permanece constante [Pawliszyn, 1997]. A repetibilidade e a exatidão dos resultados são

otimizadas com maior facilidade quando o tempo de extração usado é suficiente para que o equilíbrio de sorção seja alcançado. Esse tempo é característico de cada analito e costuma ser longo, e quando repetido com precisão possibilita excelentes respostas [Arthur & Pawliszyn, 1990]. A otimização do tempo de extração é fundamental para obter o máximo de sensibilidade e o seu valor ideal deve ser determinado experimentalmente [Lanças, 2004]. Em sua avaliação é necessário verificar se o aumento de sensibilidade alcançado com o aumento do tempo, justifica um maior tempo de análise, diminuindo a produtividade no laboratório. Geralmente, é fixado um tempo de extração de compromisso em que se pode optar por selecionar tempos de extração inferiores para não prolongar a duração das análises, trabalhando em consequências com alguns analitos em condições fora do equilíbrio. Para estas situações, pequenas variações de tempo podem causar grandes variações na resposta analítica, comprometendo a repetibilidade e a exatidão das análises. A Figura 17 mostra a influência do tempo na quantidade de analito extraída.

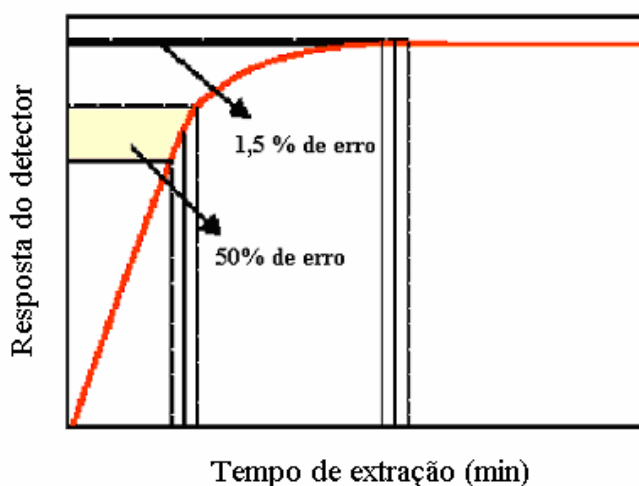


Figura 17. Influência do tempo de extração sobre a resposta analítica.
Fonte: Pawliszyn, 1997.

2.4.2.4. Efeito da velocidade de agitação

A otimização da velocidade de agitação é fundamental para diminuir o tempo de extração. A agitação magnética, por sua simplicidade, é a mais comumente utilizada. Outras técnicas como a sonicação, vibração da fibra e o movimento circular do frasco, demandam dispositivos mais complexos e de custo mais elevado [Valente & Augusto, 2000].

A quantidade de analito extraído depende entre outros fatores, da velocidade na qual o processo alcança o equilíbrio através da taxa de transferência de massa da fase líquida para a fibra. Usualmente essa taxa de transferência de massa pode ser melhorada através da agitação [Lambropoulou *et al.*, 2000].

A efetividade da agitação determinará o tempo de equilíbrio em amostras líquidas. Em geral, se considera que o tempo de equilíbrio para compostos de elevada massa molecular ou pouco voláteis se reduz mediante agitação, enquanto que o efeito para compostos voláteis será mínimo [Riu-Aumatell *et al.*, 2004].

A agitação facilita a difusão dos analitos em direção à superfície da fibra, diminuindo o efeito da redução da velocidade de extração, causada pela zona estática que se forma ao redor da fibra, e compensa os baixos coeficientes de difusão em matrizes líquidas [Riu-Aumatell, 2005].

É importante assegurar que a velocidade de agitação e a temperatura da amostra sejam mantidas constantes ao longo do processo de extração, para que o experimento seja reproduzível [Lanças, 2004].

2.4.2.5. Efeito da força iônica (adição de sal)

A adição de sal exerce forte efeito na eficiência da extração e a sensibilidade do método de extração frequentemente aumenta na presença de sal na solução [Dugay, Miège & Hennion, 1998]. Em geral, o efeito de *salting out* se amplia com a diminuição da polaridade do composto [Quinteiro *et al.*, 2003]. O aumento da força iônica provoca redução na solubilidade do analito na matriz, aumentando o coeficiente de partição dos analitos que estão na forma não ionizada, facilitando sua extração pela fibra [Lanças, 2004]. Contudo, nem sempre a adição de sal é conveniente, pois em sua presença moléculas de elevada massa molecular podem aderir ao vidro do recipiente que contém a amostra, no momento da extração [Pawliszyn, 1997].

2.4.2.6. Efeito do pH

Em meio aquoso, o pH da amostra pode afetar o equilíbrio de dissociação do analito. Por exemplo, uma diminuição no pH provoca um aumento na concentração de espécies

neutras de compostos ácidos, aumentando assim a quantidade extraída. Em geral, para compostos de caráter ácido ou básico, tais como fenóis e aminas, é imprescindível um ajuste do pH da amostra para que se obtenha o melhor desempenho na extração [Lanças, 2004]. Na prática, quando se usa a extração direta deve-se observar em que faixa de pH a fibra pode ser utilizada, pois o contato da fibra revestida com soluções ácidas ou alcalinas diminui a vida útil da mesma [Eisert & Levsen, 1996].

2.4.2.7. Influência da polaridade do meio

Em alguns casos é conveniente adicionar água, usada como solvente extrator, uma pequena quantidade de solvente orgânico miscível, para modificar a polaridade do meio. No caso de amostras ricas em lipídios e contendo analitos apolares, é conveniente a adição do solvente orgânico para aumentar a solubilidade dos analitos na fase extratora, melhorando a sua difusão desde a matriz até a fibra, de forma a favorecer o processo de extração [Doong & Liao, 2001].

2.4.2.8. Tempo de dessorção

O tempo de dessorção ideal é aquele que produz melhor sinal para um dado analito, ou o melhor perfil de sinais para um conjunto de analitos a serem determinados na mesma amostra.

Por ser uma técnica de sorção, a SPME pode estar sujeita ao efeito de memória ou *carryover*, que é caracterizado pela dessorção incompleta dos analitos sorvidos na fibra, podendo ser mais acentuada para compostos com alta afinidade pelo seu recobrimento [Lambropoulou *et al.*, 2000] ou por compostos de baixa volatilidade, neste último caso mais especificamente na dessorção térmica no injetor de um cromatógrafo a gás. Para evitar este problema é necessário verificar experimentalmente se o tempo e a temperatura de dessorção estão sendo suficientes para que todos os analitos sejam completamente dessorvidos da fibra. Esta avaliação é feita fazendo-se um branco da fibra logo após a dessorção dos analitos. Para garantir a exatidão e precisão nas análises, este procedimento deve ser realizado periodicamente.

2.4.2.9. Temperatura de dessorção

Para a dessorção térmica ser quantitativa é necessário que a temperatura do injetor esteja acima da temperatura de ebulição dos analitos e não ultrapasse a temperatura máxima suportável pelo material do revestimento da fibra [Arthur *et al.*, 1992].

Ao se aumentar a temperatura, a afinidade dos compostos pela fibra diminui. Frequentemente, a temperatura ótima de dessorção é aquela que coincide aproximadamente com a temperatura de ebulição do analito menos volátil.

A otimização da dessorção térmica pode ser realizada por três etapas consecutivas, a saber: (1) com a fibra colocada no centro da zona aquecida no injetor do GC; (2) com arraste rápido dos compostos dessorvidos da fibra, o que é conseguido usando-se no injetor um “liner” de pequeno diâmetro e, já que com a fibra inserida no “liner” é criada uma região de restrição, onde a velocidade do gás é aumentada sem necessidade de alterar a sua pressão; (3) com o injetor em temperatura que seja um compromisso entre a permitida pela fibra e a volatilidade dos analitos [Valente & Augusto, 2000].

2.4.3. Aplicações da SPME na determinação de resíduos de agrotóxicos em vegetais, frutas frescas e seus derivados.

Nos últimos anos a Microextração em Fase Sólida tem sido aplicada na extração de resíduos de agrotóxicos em amostras ambientais, como águas, solos e ar, bem como em amostras de alimento in natura ou processados. A Tabela 5 mostra um resumo das aplicações da Microextração em Fase Sólida acoplada a cromatografia a gás e a cromatografia a líquidos, com diferentes sistemas de detecção, para análise de resíduos de agrotóxicos em frutas frescas e seus derivados, como também em amostras de vegetais.

Tabela 5. Resumo das aplicações da SPME na análise de resíduos de agrotóxicos em vegetais, frutas frescas e seus derivados.

Referência	Objetivo do estudo	Tipo de amostra	Analitos	Fibra	Análise
Simplício & Villas Boas, 1999.	Determinar resíduos de pesticidas em frutas e sucos.	Pêras frescas e sucos	organofosforados	PDMS 100 µm	DI-SPME e GC-FPD
Falqui-Cao <i>et al.</i> , 2001	Associar a SPME com FMAE para determinar resíduos de pesticidas em fruta.	Morango	azoxistrobina, carbendazim, dietofencarb, napropamide e bupirimate	PDMS/DVB 65 µm	DI-SPME e LC-DAD
Zamboni <i>et al.</i> , 2002	Determinar resíduos de triazoles em vinhos e morango	Vinhos e morango	triadimefon, propiconazole, miclobutanil e penconazole.	PA 85 µm	DI-SPME e GC-MS
Lambropoulou & Albanis, 2003	Determinar resíduos de pesticidas em frutas.	Morango e cerejas	organofosforados	PDMS 100 µm	HS-SPME e GC-MS
Blasco <i>et al.</i> , 2002	Determinar resíduos de fungicidas em frutas.	Cereja, limão, laranja e pêra	dicloran, flutriafol, o-fenilfenol, procloraz e tolclofos metil	CW 50 µm	HPLC – DAD – MS/MS
Millán <i>et al.</i> , 2003	Determinar resíduos de fungicidas halogenados em vinho	Amostras de vinho	Nuarimol, folpet, triadimenol, triadimefon, Penconazole.	PDMS-DVB 60 µm	DI-SPME e HPLC-DAD
Zambonin <i>et al.</i> , 2004	Determinar resíduos de pesticidas em sucos de frutas e vinhos	Sucos e vinhos	Forate, parationa metílica, diazinon, fentiona, fenitrotion, malationa e metidationa.	PA 85 µm	DI-SPME e GC-MS
Dong <i>et al.</i> , 2005	Determinar resíduos de organoclorados e seus metabólicos em rabanete	Rabanete	BHC, o,p-DDT, p,p-DDT, o,p-DBP, o,p-DDE, p,p-DDE, p,p-DDM, p,p-DDD.	C[4]OH-TSO 60 µm	HS-SPME e GC-ECD
Lachenmeier <i>et al.</i> , 2006	Determinar resíduos de etil carbamato em frutas com caroço.	Cereja, ameixa e damasco	etil carbamato	CW/DVB 70 µm	HS-SPME e GC-MS/MS
Fytianos <i>et al.</i> , 2006	Determinar resíduos de pesticidas em frutas.	21 tipos de frutas	organofosforados	PA 85 µm	HS-SPME e GC-NPD

Continuação da tabela 5.

Referência	Objetivo do estudo	Tipo de amostra	Analitos	Fibra	Análise
Cai <i>et al.</i> , 2006	Desenvolver novas fases par determinar resíduos de organofosforados em frutas e sucos.	Maçã, tomate e suco de maçã	organofosforados	B15C5 80µm, DB18C6 80 µm, PSO18C6 84 µm, PA 85 µm e PDMS-DVB 65 µm	HS-SPME e GC-FPD
Sagrati <i>et al.</i> , 2007	Análise de carbamato e feniluréia em sucos	Laranja, maçã, cereja morango	carbofuran, carbosulfan monuron, diuron, pirimicarb, monolinuron.	CW/TPR 50 µm	DI-SPME e LC-MS
Schurek <i>et al.</i> , 2008	Determinar resíduos de pesticidas em amostras de chá.	Amostras de chá	36 compostos pertencentes as classes dos organoclorados e organofosforados	PDMS 100 µm	HS-SPME e GC×GC/TOF-MS
Zeng <i>et al.</i> , 2008	Comparar a eficiência de uma nova fase com fibras comerciais na extração de resíduos de organoclorados e piretróides em vegetais	Repolho, Alho e aipo	Bifentrina, fenpropatrina, beta-cialotrina, cialotrina, DDE, DDD, DDT	PDMS-OH 70 µm, PDMS 100 µm, PDMS/DVB 65 µm, PA 85 µm	DI-SPME e GC-ECD
Cortés-Aguado <i>et al.</i> , 2008	Determinar resíduos de 54 pesticidas em frutas e sucos.	Pêra, abacaxi e laranja	54 compostos	PDMS/DVB 65 µm	SPME e GC-MS
Vázquez <i>et al.</i> , 2008	Determinar piretróides em frutas e vegetais	Melancia e pepino	piretróides	PDMS/DVB 65 µm	DI-SPME e LC/PIF-FID
Chai & Tan, 2009	Determinar resíduos de pesticidas em frutas e vegetais.	pepino, tomate, acelga, morango e goiaba	diazinona, clorotalonil, malationa, clorpirifós, profenofos e endosulfan	PDMS 100 µm	HS-SPME e GC-ECD
Viñas <i>et al.</i> , 2009	Determinar resíduos de estrobilurinas em alimentos de bebê	Vegetais e frutas	Azoxistrobina, piraclostrobin, dimoxistrobina, trifloxistrobina, picoxistrobina.	PDMS/DVB 65 µm	DI-SPME e GC-MS

Pode-se observar que a SPME tem uma grande aplicação, podendo ser utilizada na determinação de resíduos de agrotóxicos de diferentes classes químicas, em diferentes matrizes vegetais e seus derivados, tais como sucos e vinhos. Isto se deve em parte a

disponibilidade de diferentes materiais que compõe as fases sólidas e a diversidade de sistemas de detecção aplicados aos sistemas cromatográficos.

2.5. Análises de resíduos de agrotóxicos por GC-MS e HPLC-DAD.

A cromatografia é um poderoso método de separação que pode ser empregado em várias áreas da ciência. Em suas diferentes formas tem encontrado aplicações em praticamente todas as áreas do conhecimento nas quais a análise qualitativa ou quantitativa de espécies químicas deva ser realizada [Lanças, 2004].

A cromatografia com diferentes sistemas de detecção, tem sido amplamente utilizada na análise de resíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes. A escolha entre a cromatografia a gás ou a líquidos baseia-se na natureza do analito. Sendo assim, compostos voláteis ou semi-voláteis normalmente são analisados por cromatografia a gás, enquanto compostos termicamente instáveis ou de elevada massa molecular são analisados por cromatografia a líquidos. Para a cromatografia a gás existe uma maior variedade de detectores, tais como, detector de ionização por chama (FID), detector de captura de elétrons (ECD), detector de nitrogênio e fósforo (NPD), detector fotométrico de chama (FPD), entre outros. A cromatografia a líquidos faz uso de detectores baseados em absorção no UV-Vis, em fluorescência e índice de refração, entre outros. Um grande avanço nos sistemas de detecção é o acoplamento da cromatografia com a espectrometria de massas (GC-MS ou HPLC-MS), que serve tanto para detectar a presença dos analitos, como também para identificá-los.

O sistema GC-MS faz uso de uma interface, por onde as moléculas dos analitos são carregadas da coluna cromatográfica para a fonte de íons, onde sofrem o processo de ionização e fragmentação, sendo então, direcionados para o filtro de massas.

A ionização por impacto de elétrons (EI) é o modo mais comum no GC-MS. O modo EI é um processo direto, onde energia é transferida dos elétrons, através das colisões, para as moléculas, que são ionizadas pela interação com uma corrente de elétrons (70 eV), inicialmente produzindo íons radicalares. Sob ionização, as moléculas de uma determinada substância se fragmentam com um padrão muito reproduzível. Este procedimento resulta numa fragmentação significativa das moléculas, cujo espectro resultante representa a abundância das várias razões massa/carga (m/z) [Pizzutti, 2006]. A análise do espectro de massas obtido para o

composto e a sua comparação com os espectros padrão das bibliotecas eletrônicas, servem como indícios de identificação do composto.

A ionização química (CI) é um modo complementar ao modo EI. A formação de íons por CI envolve menos energia, resultando em menos fragmentações, o espectro obtido usualmente mostra alta abundância de íons pseudomoleculares. Por este motivo, CI é frequentemente usado para determinar as massas moleculares dos componentes da amostra. Sendo assim, um composto desconhecido pode ser analisado sob condições EI, para determinar a estrutura da molécula, e condições CI, para determinar a massa molecular. Neste modo de ionização, tanto íons positivos quanto íons negativos podem ser formados, e o MS pode ser operado para medir ambos os sinais. O uso de GC-MS com CI, com ambos os modos positivo (PCI) e negativo (NCI), pode oferecer grandes vantagens nas análises de resíduos de agrotóxicos, como consequência de sua alta especificidade [Pirrutti, 2006].

Os íons formados devem ser separados de acordo com suas razões m/z . Para isso, os analisadores são usados para selecionar e filtrar os íons. Os analisadores podem ser de rádio frequência (quadrupolo ou por aprisionamento de íons), tempo de voo (TOF), transformada de Fourier e setor magnético. Os de rádio frequência são os mais utilizados. O quadrupolo é o mais usado, devido a sua facilidade de uso, faixa de massa, resolução e qualidade do espectro de massas [Skoog, Holler & Nieman, 2002]. Os analisadores de massas quadrupolo podem operar no modo *full scan* e no modo SIM (*monitoramento de íon selecionado*). No modo *full scan*, o analisador monitora uma faixa de massas e fornece informações espectrais importantes para a identificação do composto. No modo SIM, o analisador monitora somente íons específicos do composto, ou seja, monitora razões m/z específicas, proporcionando um aumento na sensibilidade. O modo SIM é mais utilizado para a quantificação de resíduos de agrotóxicos nas menores concentrações possíveis [Tahboub *et al.*, 2005].

Um aspecto importante na análise de resíduos de agrotóxicos é em relação à quantificação. Erros na quantificação, especialmente em concentrações próximas aos LMR dos compostos podem levar a sérias consequências [Patel, 2005]. A quantificação é geralmente realizada com um padrão externo. Uma forma de minimizar erros na quantificação de resíduos é preparar as soluções analíticas dos agrotóxicos no extrato da matriz ao invés de em solventes puros [Pirrutti, 2006]. O uso de padrões no extrato do branco da matriz, que não contém agrotóxicos, é uma maneira fácil e efetiva para reduzir erros de quantificação e melhorar a exatidão da calibração [Patel, 2005].

A cromatografia líquida é uma técnica importante na análise de resíduos de agrotóxicos, pois boa parte dos compostos não são suficientemente voláteis para a cromatografia a gás. O detector de absorção UV-Vis é o mais comum na cromatografia líquida, pois muitos analitos absorvem radiação ultravioleta ou visível. Os instrumentos mais versáteis possuem uma fonte de radiação e um monocromador, permitindo selecionar o comprimento de onda ótimo, no ultravioleta ou visível, mais adequado para os analitos. Quando se usa um conjunto de *fotodiodos* pode-se registrar o espectro inteiro de cada soluto assim que o analito é eluído da coluna cromatográfica. A utilização do conjunto de *fotodiodos* além de fornecer informações para a quantificação de cada analito, também fornece informações espectrais na região do UV-Vis que são úteis para a identificação de compostos. Os detectores de alta qualidade apresentam pouco nível de ruído e faixa linear que se estende por cinco ordens de grandeza da concentração do analito [Harris, 2008].

2.6. Parâmetros de validação na análise de resíduos de agrotóxicos

O desenvolvimento de métodos analíticos é extremamente importante na área de análise de resíduos de agrotóxicos presentes nas diversas matrizes. No desenvolvimento da metodologia deve-se avaliar os parâmetros que influem na sua eficiência e incluir a validação do método desenvolvido, principalmente quando envolve sua aplicação em determinado tipo de matriz e não apenas estudos com soluções padrão [Brito *et al.*, 2002]. É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios para demonstrar, por meio da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida [INMETRO, 2007]. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento.

No Brasil a ANVISA e o INMETRO são as agências credenciadas para verificar a competência de laboratórios de ensaios e estes órgãos adotam semelhantes critérios para a validação de uma metodologia analítica. A Tabela 6 faz uma comparação entre os critérios adotados pela ANVISA e INMETRO.

Dentre os critérios citados, a exatidão e a precisão são considerados os mais relevantes porque permitem estimar os erros e variações embutidas nos resultados analíticos. A exatidão

pode ser estimada pelo cálculo do erro absoluto e relativo e a precisão pelas medidas de dispersão, como desvio-padrão, variância e coeficiente de variação [Brito *et al.*, 2002].

A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo [INMETRO, 2007].

Tabela 6. Comparação entre os critérios adotados pela ANVISA e INMETRO para a validação de métodos analíticos.

INMETRO	ANVISA
Especificidade/Seletividade	Especificidade/Seletividade
Faixa de trabalho e Faixa linear de trabalho	Intervalos da curva de calibração
Linearidade	Linearidade
Limite de detecção (LOD)	Curva de calibração
Limite de quantificação (LOQ)	Limite de detecção (LOD)
Sensibilidade (inclinação da curva)	Limite de quantificação (LOQ)
Exatidão e tendências	Exatidão
Precisão	Precisão
- Repetibilidade	- Repetibilidade (precisão intra-corrída)
- Precisão intermediária	- Precisão intermediária (Precisão inter-corrída)
- Reprodutibilidade	- Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)
Robustez	Robustez
Incerteza de medição	

Fonte: Ribani *et al.*, 2004.

A seletividade pode ser avaliada comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz fortificada com esta substância (padrão), para isso, o composto deve estar bem separado dos demais compostos presentes na amostra. O uso de detectores modernos como arranjo de diodos e o espectrômetro de massas também podem ser utilizados para avaliar a

seletividade, fazendo-se a comparação do espectro do pico obtido na separação com o de um padrão. Quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse utiliza-se o método de adição padrão para avaliar a seletividade. Para isso é necessário construir uma curva analítica com adição da substância de interesse na amostra e uma curva analítica sem a presença da matriz, se as duas curvas analíticas forem paralelas, pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse, portanto o método é seletivo [Ribani *et al.*, 2004].

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A faixa linear de trabalho de um método analítico é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado. A concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. Os valores medidos obtidos têm que estar linearmente correlacionados às concentrações. Isto requer que os valores medidos próximos ao limite inferior da faixa de trabalho possam ser distinguidos dos brancos do método [INMETRO, 2007].

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular do gráfico analítico. Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. Esse critério expressa a capacidade do procedimento analítico gerar variação no sinal analítico, causada por pequeno incremento na concentração ou quantidade do analito [Brito, *et al.*, 2003].

O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O LOD pode ser obtido utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de modo que se possa distinguir o sinal analítico do ruído, pela visualização da menor concentração visível (detectável). Outra forma de estabelecer o LOD é fazer uma comparação entre a medida dos sinais de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito e um branco da matriz isenta do analito. Normalmente a relação sinal-ruído na proporção 3:1 é aceita como o limite de detecção. O LOD também pode ser calculado utilizando os parâmetros

da curva analítica pela relação $LOD = 3,3 \cdot (s/S)$, onde, s é a estimativa do desvio padrão da resposta da equação da linha de regressão ou o coeficiente linear da equação e S é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica [Ribani, *et al.*, 2004]. Entretanto, quando se utiliza estes critérios teóricos para a determinação do LOD, faz-se necessário a confirmação na prática, destes valores.

O limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida no procedimento analítico, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas. A determinação do LOQ representa um compromisso entre a concentração, a precisão e a exatidão exigidas. Desta forma, quando decresce o nível de concentração do LOQ, a medição torna-se menos precisa e se houver necessidade de maior precisão, uma concentração maior deve ser registrada para o LOQ [Ribani, *et al.*, 2004].

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro [González, *et al.*, 1999]. O estudo da exatidão pode ser feito com o uso de material de referência certificado, por comparação do método proposto com um método de referência, por ensaios de recuperação ou por adição padrão [Brito, *et al.*, 2003]. Os materiais de referência possuem certificados que informam os valores de concentração de cada substância padrão. Os valores obtidos pelo laboratório (a média e a estimativa do desvio padrão de uma série de replicatas) da mesma amostra padrão devem ser comparados com os valores certificados do material de referência, para verificar a exatidão do método [Ribani, *et al.*, 2004]. A exatidão também pode ser estabelecida mediante comparação entre os valores obtidos pelo método proposto com os valores obtidos para as mesmas amostras com outro método validado (método com precisão e exatidão avaliadas). Após análise de diferentes amostras com ambos os métodos, as diferenças obtidas para cada amostra são calculadas e comparadas com o valor desejado. Estabelece-se, então, o nível de confiança de acordo com o intervalo de concentração (menores valores de concentração causam maior dispersão dos dados aumentando o limite de confiança) [Brito, *et al.*, 2003].

O ensaio de recuperação constitui o parâmetro mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo

[González, *et al.*, 1999]. O estudo da recuperação consiste na "fortificação" da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado, obtendo uma relação percentual entre a concentração determinada mediante aplicação do procedimento analítico e o nível de fortificação [Brito, *et al.*, 2003].

Na análise de resíduos de agrotóxicos a validação do método ocorre, usualmente, por meio de ensaios de recuperação, pois são realizados no próprio laboratório, sem adesão de outros laboratórios ou existência prévia de métodos validados para o analito e a matriz em estudo [Brito *et al.*, 2002]. Na análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos toma-se como base os Limites Máximos de Resíduos (LMR), estabelecidos pela legislação para cada analito e matriz. Para demonstrar a eficiência do método, deve-se efetuar o estudo da recuperação em níveis de concentração inferior, igual e superior ao LMR estabelecido para o analito de interesse presente na matriz específica. Os valores de recuperação considerados adequados são estabelecidos em função da concentração do analito.

No método de adição padrão, quantidades conhecidas da substância são adicionadas em diferentes níveis numa matriz da amostra, antes do procedimento de preparo da amostra, que já contenha quantidades (desconhecidas) da substância. A concentração da substância de interesse na amostra original pode ser determinada gráfica e matematicamente. A amostra sem adição do padrão e cada uma das amostras com o padrão adicionado devem ser analisadas e as quantidades medidas relacionadas com a quantidade adicionada [Ribani, *et al.*, 2004].

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. As duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetibilidade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio-padrão ou coeficiente de variação (CV) [Stubberud & Astrom, 1998]. Para análise de resíduos de agrotóxicos consideram-se aceitáveis coeficientes da variação de até 20% [Brito, *et al.*, 2003]. A repetibilidade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, que podem ser efetuadas no mesmo dia (repetibilidade intra-dia) ou em dias diferentes (repetibilidade inter-dias), que é denominada de "precisão intermediária". A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição, tais como, resultados de ensaios

obtidos com o mesmo método, variando-se laboratórios, operadores ou equipamentos [INMETRO, 2007].

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado [INMETRO, 2007]. No caso de métodos cromatográficos, as variações referem-se a diferentes marcas de colunas, temperatura e fluxo, entre outras [Nijhuis, *et al.*, 1999]. Os testes de robustez, em geral, servem para indicar os fatores que podem influenciar, significativamente, a resposta do método estudado.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Desenvolver metodologias analíticas por Microextração em Fase Sólida (SPME) e análise por GC-MS e HPLC-UV-Vis para a determinação de resíduos de agrotóxicos em manga.

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver um procedimento analítico, baseado na microextração em fase sólida (SPME), para extrair da matriz manga resíduos dos agrotóxicos aplicados em frutos produzidos na região produtora do Platô de Neópolis (SE) e comercializados em Salvador (BA) e Aracaju (SE);

- Obter as condições cromatográficas por GC-MS e HPLC-UV-Vis para análise dos agrotóxicos selecionados;

- Validar os métodos desenvolvidos;

- Aplicar os métodos desenvolvidos em amostras de manga comercializadas em Salvador-BA e Aracaju-SE.

4. Materiais e Métodos

4.1. Materiais

Béquer (50 e 250mL), bastão de vidro, proveta (10,0 a 100,0mL), balão volumétrico (5,0; 10,0 e 25,0 mL), placa de aquecimento (Fisatom, modelo 752A, Brasil), estufa (FANEM, modelo 315 SE, São Paulo, Brasil), centrífuga (FANEM, modelo Excelsa 2, São Paulo, Brasil), micropipeta (2-20, 20-200 e 100-1000 μ L, eppendorf, Hamburg, Alemanha), balança analítica (Sartorius analytic, Goettinger, Alemanha), seringa para injeção manual dos padrões no GC (10 μ L, Hamilton, Nevada, USA) e no HPLC (100 μ L, Hamilton, Nevada, USA).

4.2. Reagentes e solventes

Padrões certificados de abamectina, clofentezina, carbofuran, carbosulfan, fentiona, tiabendazol, bifentrina, imazalil, difenoconazol, permetrina, procloraz, piraclostrobina e azoxistrobina foram adquiridos da AccuStandard (New Haven, USA), todos com grau de pureza superior a 97,0%. Padrões certificados de parationa metílica (1000 μ g mL⁻¹), malationa (1000 μ g mL⁻¹), diazinona (1000 μ g mL⁻¹) foram adquiridos da Absolute Standards (Hamdem, CT, USA). Metanol e acetonitrila grau HPLC foram adquiridos da J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) e isopropanol adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha), cloreto de sódio (99,0% de pureza) foi adquirido da Nuclear (São Paulo, Brasil).

4.3. Preparo das soluções

As soluções-padrão de estoque foram preparadas com concentrações de 400 μ g mL⁻¹ (azoxistrobina), 1000 μ g mL⁻¹ (procloraz), 1000 μ g mL⁻¹ (tricolorfon), 1000 μ g mL⁻¹ (tiabendazole) e 400 μ g mL⁻¹ (imazalil) em metanol; 400 μ g mL⁻¹ (piraclostrobina), 350 μ g mL⁻¹ (carbosulfan), 400 μ g mL⁻¹ (fentiona), 400 μ g mL⁻¹ (abamectina), 1000 μ g mL⁻¹ (bifentrina), 400 μ g mL⁻¹ (difenoconazole) e 1000 μ g mL⁻¹ (carbofuran) em acetonitrila e 400 μ g mL⁻¹ (clofentezina), 300 μ g mL⁻¹ (permetrina), 100 μ g mL⁻¹ (parationa metílica), 100 μ g mL⁻¹ (malationa) em acetato de etila e foram armazenadas em freezer a - 18°C. A partir

destas foram preparadas soluções-padrão de trabalho em metanol com concentrações de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ para cada composto. As soluções de trabalho também foram armazenadas no freezer a -18°C e utilizadas no máximo por três semanas, em função da sua degradação.

4.4. Limpeza dos materiais

Os materiais utilizados no preparo das soluções e durante as extrações foram lavados seguindo o seguinte procedimento:

- Enxágue em água corrente, por três vezes;
- Lavagem com solução de extran neutro a 2%;
- Enxágue em água corrente, por três vezes;
- Lavagem com solução de potassa alcoólica;
- Enxágue em água corrente, por três vezes;
- Enxágue com água ultra-pura;
- Enxágue com acetonitrila e secagem;
- Cobrir com papel filme as extremidades abertas e guardar em armários fechados.

4.5. Seleção dos agrotóxicos

A seleção dos agrotóxicos a serem estudados é uma etapa importante no desenvolvimento do estudo, pois um método deve ser desenvolvido e validado para a determinação de compostos que realmente sejam utilizados na cultura específica do estudo, possibilitando a geração de informações em um panorama real, com grande relevância para a sociedade. Estes compostos foram selecionados após uma visita a produtores de manga no projeto irrigado “Platô de Neópolis”, localizado a margem direita do rio São Francisco, no município de Neópolis, Estado de Sergipe, Brasil ($10^\circ 19' 12''\text{S}$, $36^\circ 34' 46''\text{W}$) e também baseado na relação de compostos autorizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para serem aplicados na cultura da manga.

4.6. Equipamentos

A otimização das condições de extração dos agrotóxicos da matriz manga por SPME e determinação por GC-MS foi desenvolvida com um autoamostrador CTC Combi-PAL (Zwinger, Suécia) acoplado a um sistema GC-MS Shimadzu modelo QP2010 Plus (Kyoto, Japão) e coluna de sílica fundida Rtx®-1 MS (Crossbond® 100% dimetil polisiloxano; 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm), (Restek, Bellefonte, PA, USA). A Figura 18 mostra o sistema SPME-GC-MS utilizado nestas etapas.



Figura 18. Sistema SPME-GC-MS utilizado na determinação e otimização das condições de extração dos agrotóxicos na matriz manga.

O desenvolvimento das condições cromatográficas para a separação dos agrotóxicos por cromatografia líquida foi executado em cromatógrafo a líquidos da Agilent modelo 1100 Series (Waldbronn, Alemanha), com degassador modelo G1379A, sistema binário de bombas modelo G1312A, auto injetor modelo G1313A e detector DAD modelo G1315B. A Figura 19 mostra o cromatógrafo Agilent utilizado nesta etapa.



Figura 19. Sistema utilizado no desenvolvimento das condições cromatográficas para análise dos agrotóxicos por SPME-HPLC-DAD.

Em virtude do incêndio que ocorreu no Instituto de Química da UFBA, essa etapa da otimização das condições de dessorção e a determinação de resíduos de agrotóxicos extraídos da matriz manga por SPME-HPLC-DAD foi desenvolvida no Laboratório de análise de combustíveis e poluentes orgânicos (LCP), Departamento de Química, Universidade Federal de Sergipe, utilizando o cromatógrafo a líquidos modelo LC-ProStar da Varian (Palo Alto, CA, USA) com sistema binário de bombas, modelos 210/215 SD-1 e detector UV-Vis modelo 325 LC UV-Vis. A separação dos compostos foi realizada usando uma coluna XTerra® MS C₁₈ 5 µm (250 mm x 2.1 mm) da Waters (Milford, Massachusetts, USA). A Figura 20 mostra o sistema com a interface de acoplamento SPME-HPLC que foi utilizado.

Para a dessorção e injeção dos analitos no cromatógrafo a líquidos foi utilizada a interface de acoplamento SPME-HPLC modelo Rheodyne®, com uma válvula de seis portas e câmara de dessorção de 60 µL (Supelco, Bellefonte, PA, USA).



Figura 20. Sistema utilizado para a determinação de resíduos de agrotóxicos da matriz manga por SPME-HPLC-UV-Vis .

Para a extração dos agrotóxicos por SPME foi utilizado o holder modelo 23GA (Supelco, Bellefonte, PA, USA) para o autoamostrador e foram testadas as fibras recobertas com poliacrilato (85 μm), polidimetilsiloxano (100 μm), polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (65 μm), divinilbenzeno-carboxen-polidimetilsiloxano (50 μm) e Carboxen-polidimetilsiloxano (85 μm), as quais foram previamente condicionadas seguindo as instruções do fabricante (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Durante a etapa de otimização das condições de extração dos agrotóxicos por SPME e análise por GC-MS, foi observada a presença de um interferente proveniente da matriz que gerava um grande sinal na resposta do detector . A identificação do interferente foi feita em um sistema GC-MS/MS que consistia em um cromatógrafo a gás CP-3800 acoplado a um espectrômetro de massas 320-MS da Varian (Palo Alto, CA, USA), com uma coluna de sílica fundida VF-5 MS (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano; 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 μm), (Varian, Lake Forest, CA, USA).

4.7. Condições cromatográficas estabelecidas para as análises por GC-MS.

As análises por cromatografia a gás foram realizadas em um sistema Shimadzu GC-MS modelo QP2010 Plus, equipado com injetor split/splitless, operando no modo splitless com

amostragem de 5 min e mantido a 280°C. Para a separação dos agrotóxicos foi empregada uma coluna de sílica fundida Rtx®-1 MS, utilizando hélio (pureza de 99,99%) como gás de arraste com um fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹. A temperatura da coluna seguiu a seguinte programação: 60°C por 1 min, aquecida até 170°C a 25°C min⁻¹, em seguida aquecida até 290°C a 6°C min⁻¹, permanecendo nesta temperatura por 1 min, com tempo total de corrida de 26,5 min. As condições de análise utilizadas no espectrômetro de massas eram: linha de transferência aquecida a 250°C, ionização por impacto de elétrons a 70 eV e fonte de íons aquecida a 230°C.

4.8. Condições cromatográficas estabelecidas para as análises por HPLC-UV-Vis.

A separação dos compostos tiabendazol, carbofuran, azoxistrobina, procloraz, fentiona, clofentezina, permetrina, abamectina, carbosulfan e bifentrina foi realizada usando uma coluna de fase reversa C₁₈ 5µm (250 mm x 2.1 mm), utilizando como fase móvel uma mistura de água e acetonitrila, com um gradiente partindo com 30% de acetonitrila, seguido de um aumento até atingir 70% em 6 min, seguido por um suave incremento até atingir 80% em 18 min, seguido por um aumento até atingir 100% em 22 min, permanecendo com esta composição até os 32 min, retornando para as condições iniciais aos 35 min e permanecendo nestas condições por 7 min para o condicionamento da coluna, com um tempo total de análise de 42 min e fluxo constante de 0,25 mL min⁻¹. O detector UV-Vis operou nos 26,5 min iniciais em 203 nm, entre 26,5 e 31 min em 245 nm e de 31 a 42 min novamente em 203 nm.

4.9. Aquisição de amostras para o desenvolvimento do método

As amostras de manga livres de agrotóxicos (amostras testemunhas) usadas no desenvolvimento dos métodos por SPME-GC-MS e SPME-HPLC-UV-Vis foram adquiridas de uma plantação orgânica localizada no Município de Salgado, Estado de Sergipe, Brasil (10°37'21"S e 37°28'56"W), nos períodos de janeiro de 2007, novembro de 2007, fevereiro de 2008 e abril de 2009.

As amostras selecionadas como “testemunhas” foram conservadas da forma como foram coletadas e ao chegar ao laboratório, foram processadas e homogeneizadas sem lavar, na sua forma *in natura* (casca e polpa), em liquidificador FAET (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e

armazenadas em frascos âmbar a -18°C , até o momento da análise. Momentos antes da extração, a manga processada era retirada do freezer e deixada à temperatura ambiente até descongelar.

4.10. Procedimento de extração por DI-SPME e dessorção no GC-MS.

Uma amostra de 3g de manga processada foi pesada em um frasco de vidro de 20 mL e fortificada com volume apropriado da solução de trabalho (10 mg L^{-1}), permanecendo em repouso por 30 min. Em seguida foi adicionado 10 mL de uma mistura de isopropanol/água (20/80 v/v) contendo NaCl a 5% e de pH 3, ajustado por adição de solução aquosa de HCl. A mistura foi agitada com agitação magnética a 1000 rpm durante 10 min e centrifugada a 5000 rpm por 15 min. O sobrenadante obtido foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL e avolumado com a mistura de isopropanol/água. Em seguida, foi transferida para um vial de 10 mL com tampa magnética e realizada a microextração em fase sólida no autoamostrador CTC Combi-PAL.

Inicialmente foi feito o condicionamento da fibra de poliacrilato (PA), expondo-a no injetor do cromatógrafo a gás, durante 30 minutos a temperatura de 300°C , de acordo com as recomendações do fabricante. A extração foi realizada com imersão direta (DI-SPME) a 50°C durante 30 min e agitação de 250 rpm em momentos alternados de 30 seg com agitação e 10 seg em repouso. Após a extração, a fibra foi introduzida no injetor do cromatógrafo a gás para a dessorção dos analitos, que foi realizada a 280°C durante 5 min. Após cada extração a fibra era limpa com aquecimento a 280°C em atmosfera inerte com a passagem de hélio durante 1 min. Periodicamente era realizado um branco da fibra para avaliar o efeito de memória.

4.11. Procedimento de extração por DI-SPME e dessorção no HPLC-UV-Vis.

Inicialmente foi feito o condicionamento da fibra de polidimetilsiloxano (PDMS 100 μm) na interface de acoplamento SPME-HPLC, mantendo a fibra inserida na câmara de dessorção, passando pelo sistema a fase móvel por 30 min (modo dinâmico) e em seguida, mantendo a fibra inserida na câmara preenchida com ACN, por mais 15 min (modo estático), seguindo as recomendações do fabricante. Após o condicionamento, foi realizado um branco da fibra para verificar a presença de interferentes.

O procedimento de extração para análise por HPLC-UV-Vis foi igual ao descrito no item anterior utilizando uma fibra de PDMS (100 μ m). Entretanto, as extrações foram realizadas manualmente. Após a extração foi realizada a dessorção no modo estático com a câmara preenchida com ACN, seguindo o procedimento descrito logo abaixo. Após cada extração e dessorção foi feita uma limpeza da fibra, mergulhando-a em um frasco de vidro contendo a fase móvel (água:ACN, 70:30 v/v) sob agitação magnética a 250 rpm por 10 min. Periodicamente era realizado um branco da fibra para avaliar a eficiência do processo de limpeza.

A dessorção dos agrotóxicos na interface SPME-HPLC com o modo estático foi realizada seguindo o procedimento descrito abaixo:

a. Com a válvula na posição “load” foi introduzida a agulha da seringa (HPLC) na vedação da interface (Figura 21) e a câmara (volume interno de 60 μ L) foi preenchida passando-se um excesso de ACN (500 μ L) para a sua limpeza prévia. O excesso de solvente saía como resíduo na porta 5.

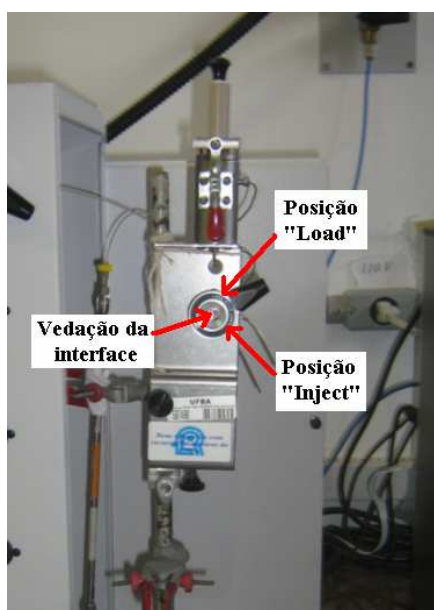


Figura 21. Interface SPME-HPLC com destaque para as posições “load” e “inject” e a vedação da interface.

b. Com a câmara já preenchida com ACN, foi feito o desbloqueio do selo para introduzir a fibra na interface. O desbloqueio é feito levantando o grampo conforme as Figuras 22a e 22b.

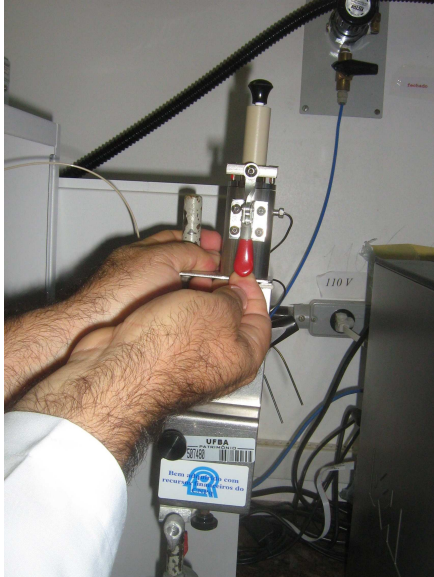


Figura 22a. Desbloqueio do selo.



Figura 22b. Desbloqueio do selo.

c. Com o selo desbloqueado, foi retirada a agulha de proteção da interface (Figura 23) e introduzida a agulha do *holder* (Figura 24).

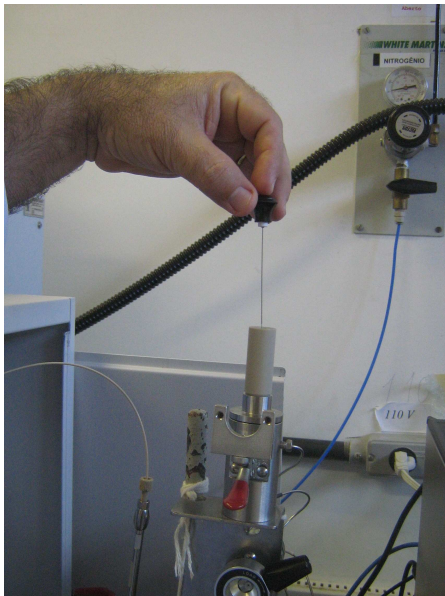


Figura 23. Retirando a agulha da interface.

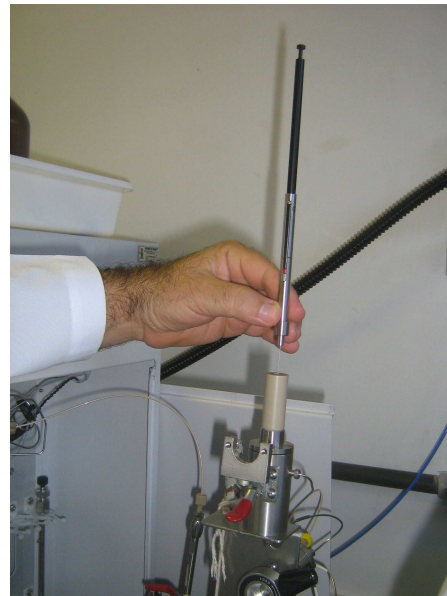


Figura 24. Introduzindo a fibra na interface.

d. Em seguida, a fibra foi exposta, empurrando o êmbolo para baixo (Figura 25), fechando-se o grampo e deixando a fibra em contato com a ACN por 15 min (Figura 26).

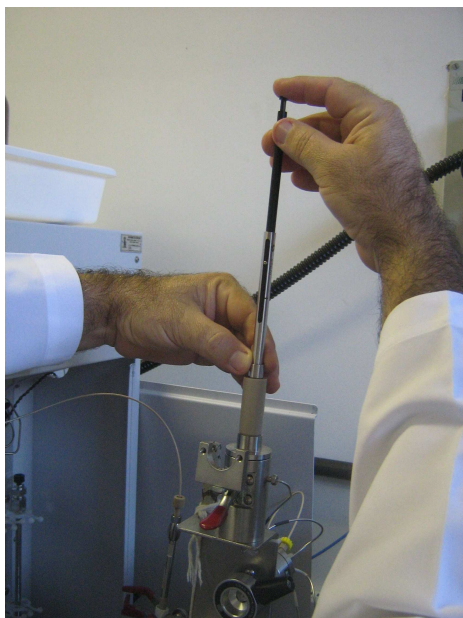


Figura 25. Exposição da fibra na câmara.



Figura 26. Dessorção em ACN (15 min).

e. Após 15 min o grampo foi aberto (Figura 27), a fibra recolhida para o interior da agulha e o *holder* removido da interface (Figura 28).

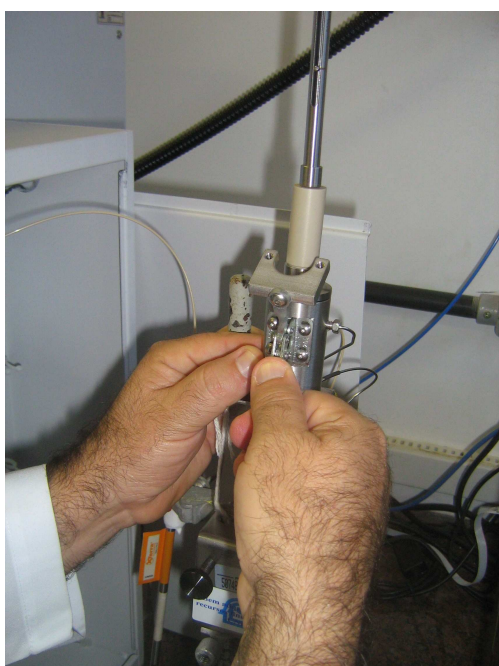


Figura 27. Abertura do grampo.

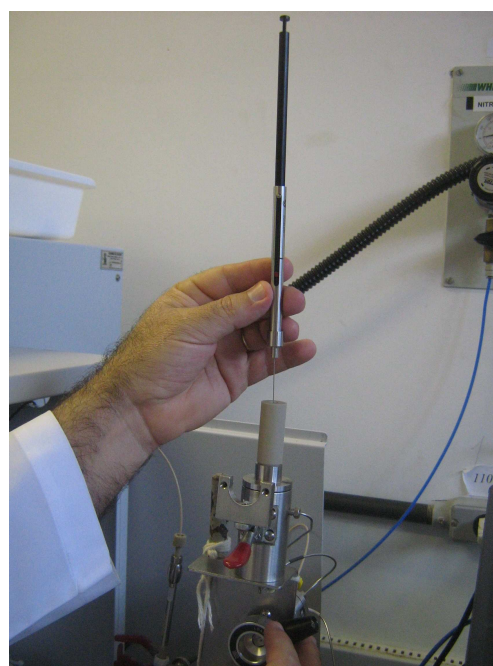


Figura 28. Removendo o *holder* da interface.

f. Após remover o *holder*, a agulha de vedação foi recolocada na interface e o grampo foi travado para bloquear o selo.

g. Para iniciar a análise, a válvula que estava na posição “load” (Figura 29a) foi virada para a posição “inject” (Figura 29b), permitindo que a fase móvel começasse a circular pela câmara, para conduzir os agrotóxicos extraídos na acetonitrila para serem separados na coluna cromatográfica.



Figura 29a. Válvula na posição “load”.



Figura 29b. Válvula na posição “inject”.

h. 5 minutos após o início da análise, a válvula foi retornada para a posição “load”. Este procedimento foi adotado para diminuir o volume morto no percurso da fase móvel, a fim de evitar o alargamento dos picos.

i. Após cada dessorção a fibra foi imersa em um vial de 10 mL contendo a fase móvel, permanecendo sob agitação a 250 rpm para a remoção de interferentes extraídos da matriz que não foram dessorvidos quando a fibra ficou imersa no solvente. Periodicamente era feito um branco da fibra após a limpeza para avaliar a eficiência do procedimento de limpeza.

5. Resultados e Discussão

5.1. Otimização das condições cromatográficas para as análises por GC-MS.

A otimização dos tempos de retenção dos agrotóxicos foi realizada com injeção de 1,0 μL de soluções-padrão de cada agrotóxico na concentração de 1,0 mg L^{-1} no modo SCAN e confirmação por comparação dos espectros de massas obtidos com os espectros de massas das bibliotecas eletrônicas NIST 147 e WILLEY MS Library. Após a identificação de cada composto foi avaliada a resolução na separação dos quatorze compostos presentes em uma mistura, efetuando-se injeções de 1,0 μL de uma mistura padrão de concentração 1,0 mg L^{-1} no modo SCAN (varredura). Com base na intensidade relativa foram selecionados os íons de quantificação e de confirmação de cada agrotóxico para serem monitorados no modo SIM (*Selected ion monitoring*). Foram monitorados três íons para cada composto, utilizando o íon de maior intensidade para a quantificação e mais dois íons como qualificadores. A Tabela 7 mostra os tempos de retenção, o íon de quantificação e os íons qualificadores de cada composto.

A Figura 30 mostra um cromatograma obtido no modo SIM, resultante da injeção de 1 μL de uma mistura padrão de concentração 1,0 mg L^{-1} e a Figura 31 mostra um cromatograma obtido no modo SIM, resultante da extração dos agrotóxicos por DI-SPME em presença da matriz fortificada na concentração de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, onde podemos observar que a resolução cromatográfica foi satisfatória na separação dos quatorze compostos presentes na matriz manga. É importante ressaltar que o difenoconazol e a permetrina apresentam estereoisômeros e dois picos são detectados para cada um deles correspondendo às configurações *cis*(Z) e *trans* (E). A Figura 32 mostra um cromatograma obtido no modo SIM, na extração por DI-SPME no extrato da matriz manga utilizada como amostra testemunha (branco da matriz).

Tabela 7. Tempos de retenção, íon de quantificação e íons qualificadores de cada composto.

Composto	$T_{Reten\c{c}ao}$ (min)	Íon de quantificação	Íons qualificadores
Clofentezina	5,03	137	102 e 109
Carbofuran	9,25	164	149 e 131
Diazinon	10,09	137	179 e 152
Parationa metílica	11,10	125	109 e 263
Malationa	12,04	127	93 e 173
Fentiona	12,27	278	125 e 109
Tiabendazol	13,29	201	174 e 129
Imazalil	14,67	41	215 e 173
Bifentrina	18,73	181	165 e 166
Permetrina	21,28	183	163 e 165
Procloraz	21,69	70	43 e 215
Piraclostrobina	23,98	132	164 e 325
Difenoconazol	24,71	265	323 e 267
Azoxistrobina	25,30	344	388 e 329

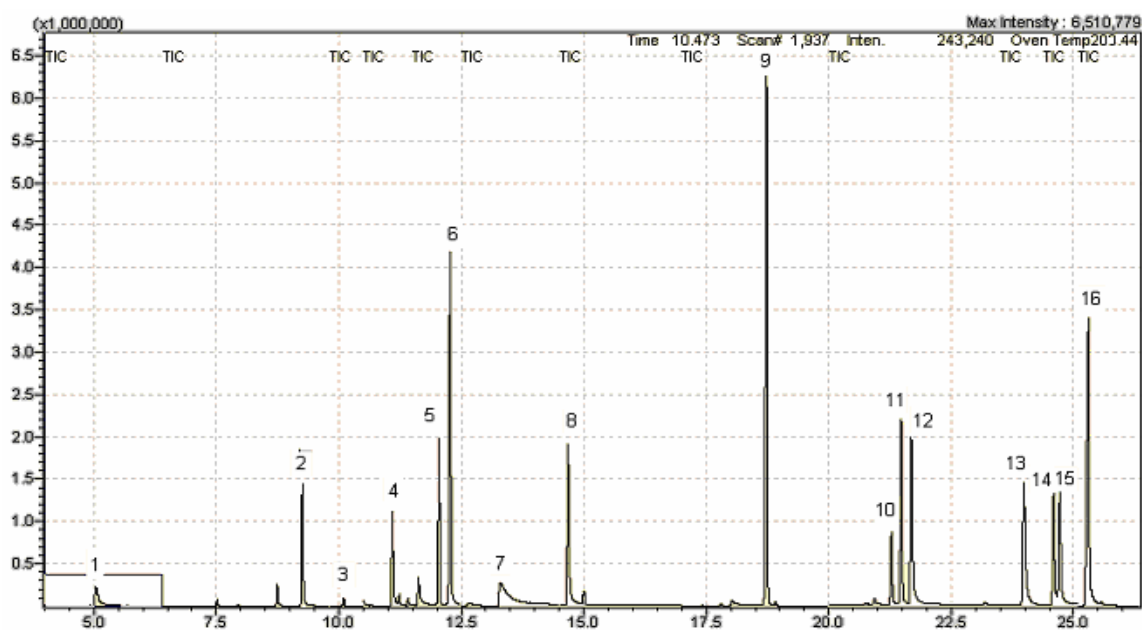


Figura 30. Cromatograma obtido por GC-MS (modo SIM) na injeção de 1,0 μL de uma mistura padrão dos agrotóxicos na concentração de 1,0 mg L^{-1} . Identificação dos picos: 1. clofentezina; 2. carbofuran; 3. diazinon; 4. parationa metílica; 5. malationa; 6. fentiona; 7. tiabendazol; 8. imazalil; 9. bifentrina; 10 e 11. permetrina; 12. procloraz; 13. piraclostrobina; 14 e 15. difenoconazol; 16. azoxistrobina.

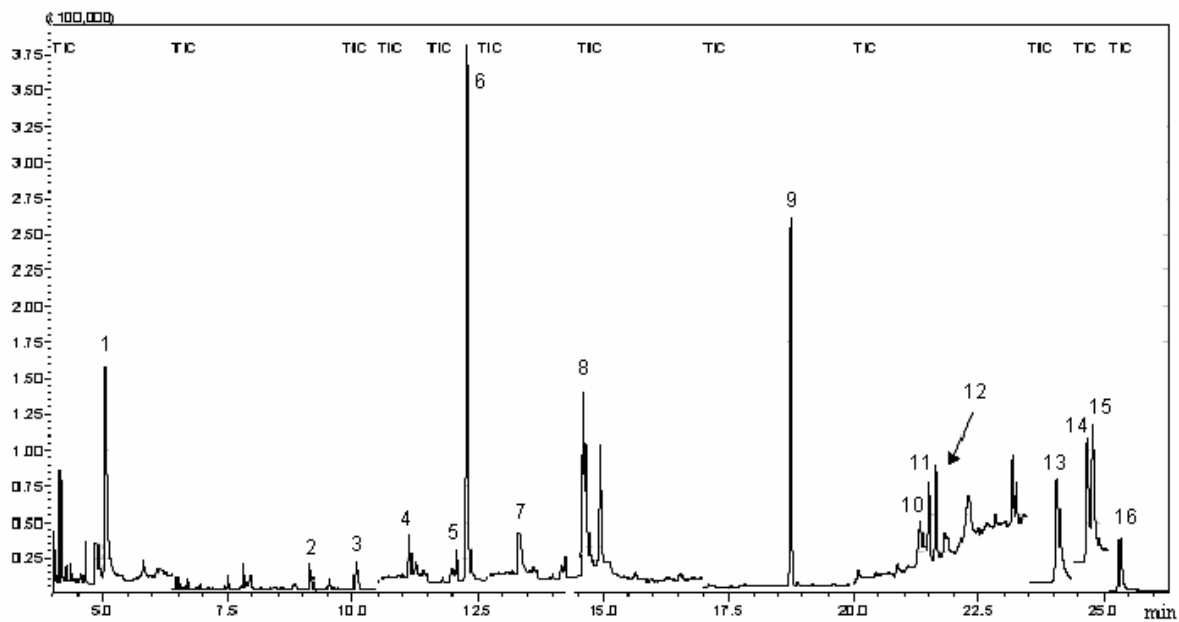


Figura 31. Cromatograma obtido por GC-MS (modo SIM) na extração dos agrotóxicos por DI-SPME, efetuada na matriz manga fortificada a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Identificação dos picos: 1. clofentezina; 2. carbofuran; 3. diazinon; 4. parationa metílica; 5. malationa; 6. fentiona; 7. tiabendazol; 8. imazalil; 9. bifentrina; 10 e 11. permetrina; 12. procloraz; 13. piraclostrobina; 14 e 15. difenoconazol; 16. azoxistrobina.

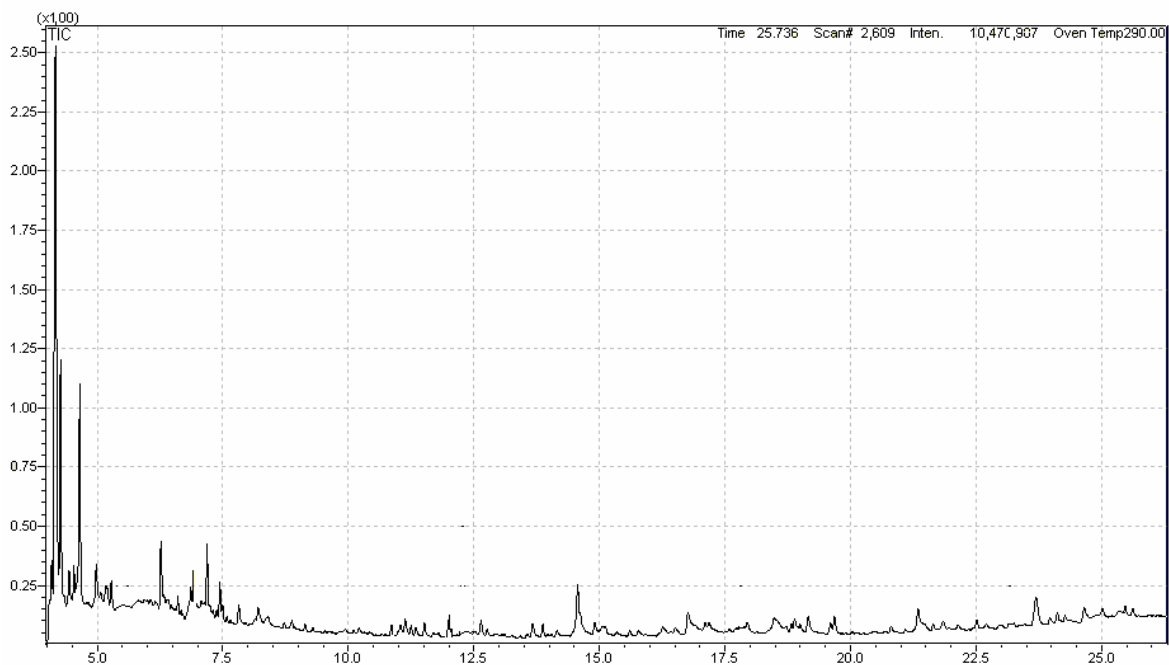


Figura 32. Cromatograma obtido por GC-MS (modo SIM) na extração por DI-SPME, efetuada no extrato da matriz manga (branco da matriz).

5.2. Efeito da matriz

Um dos problemas na determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes vegetal se refere ao efeito da matriz ou efeito da resposta cromatográfica acentuada induzida pela matriz. Este fenômeno sugere que componentes da matriz presentes na amostra podem co-eluir com os analitos provocando um aumento na resposta do detector. Os componentes da matriz também podem bloquear os sítios ativos no injetor e desse modo prevenir uma possível degradação e adsorção de analitos nessa câmara de vaporização [Bernal *et al.*, 1997]. O efeito da matriz pode gerar sérios problemas analíticos, devido à possível superestimação da concentração dos analitos [Zrostlíková *et al.*, 2001].

O efeito matriz também pode ser observado quando repetidas injeções da amostra tendem a formar uma “crosta” de componentes na cabeça da coluna, originando uma nova “fase”, que afeta o caráter da eluição e retenção dos analitos em contato com ela [Menezes Filho, 2005]. A descontinuidade desta nova fase com a fase da coluna analítica pode produzir o alargamento dos picos, afetando diretamente a resolução cromatográfica e a precisão das análises [Dórea, 1999].

As Figuras 33 e 34 mostram a influência da matriz na resposta analítica da fentiona e do difenoconazol, respectivamente. Pode-se notar uma diferença na inclinação das curvas analíticas obtidas com a extração dos compostos por SPME e análise por GC-MS, quando os compostos estão em presença de água e quando são preparados em um extrato da matriz. É possível observar que a inclinação da curva obtida com os compostos no extrato da matriz é maior que o da curva construída com os compostos preparados em água. Quanto maior o ângulo de inclinação na curva de calibração, maior é a sensibilidade, mostrando que ocorre um aumento na sensibilidade do método, que irá induzir a um erro por excesso, caso a curva de calibração seja construída em água.

Como o sinal analítico obtido com os padrões em presença do extrato da matriz é maior, a construção da curva de calibração com os padrões dos analitos preparados diretamente no extrato da matriz, pode eliminar ou reduzir a influência da matriz por compensação. Outra possibilidade para reduzir a influência da matriz é aumentar a eficiência e seletividade no procedimento de extração ou realizar uma limpeza mais extensiva do extrato [Zrostlíková *et al.*, 2002]. Entretanto, esta última alternativa pode ocasionar um aumento no

tempo de extração e redução nos valores de recuperação, em função de perda nas sucessivas etapas de clean-up ou purificação para limpeza do extrato [Menezes Filho, 2005].

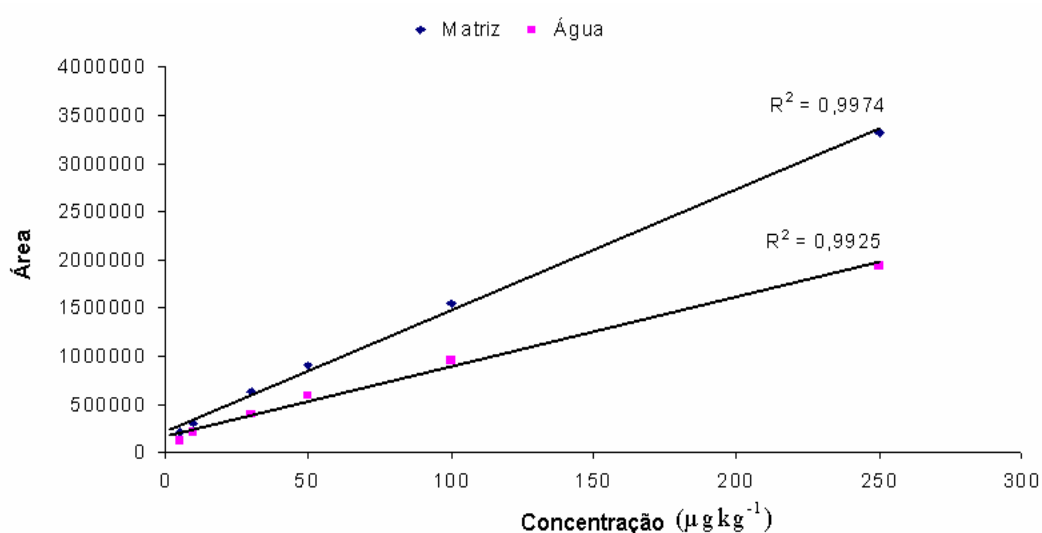


Figura 33. Comparação da resposta analítica da fentiona obtida por SPME e análise por GC-MS, quando o composto é preparado em água e no extrato da matriz.

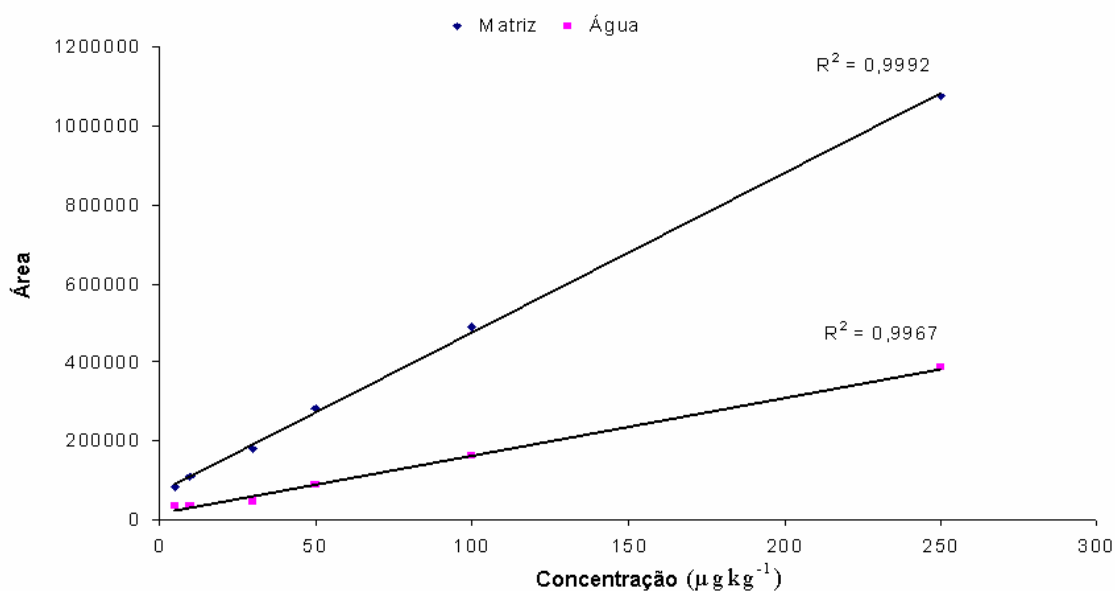


Figura 34. Comparação da resposta analítica do difenoconazol obtida por SPME e análise por GC-MS, quando o composto é preparado em água e no extrato da matriz.

O fenômeno descrito para a fentiona e o difenoconazol, também foi observado para o carbofuran, diazinon, parationa metílica, imazalil, procloraz, piraclostrobina e azoxistrobina. Com o tiabendazol ocorreu uma situação extrema em relação ao descrito anteriormente, pois este composto quando está em presença da matriz é extraído por SPME e quando na presença apenas de água a extração não ocorre. Isso deve ser resultado de fortes interações entre o tiabendazol e a água, que são mais fortes que as interações entre o analito e a fibra, dificultando a transferência de massa do analito presente na água para a fibra. Com os piretróides bifentrina e permetrina foi observada uma maior resposta analítica dos compostos quando os mesmos foram preparados em água. Com base nos valores do coeficiente de partição octanol/água da bifentrina ($\log K_{ow} = 7,3$) e permetrina ($\log K_{ow} = 6,1$), pode-se justificar este comportamento pela grande afinidade que estes compostos possuem pela matriz que é rica em lipídios, ou seja, os piretróides apresentam maior afinidade pela matriz e não são facilmente disponibilizados para o meio aquoso, provocando menores respostas nos sinais analíticos. Quando os mesmos estão dissolvidos em água as interações entre os analitos e a fase sorvente (fibra) são mais fortes do que as interações entre estes compostos e a água, facilitando a transferência de massa do meio aquoso para a fase sólida com conseqüente aumento da resposta analítica. A figura 35 mostra a comparação entre as respostas analíticas da bifentrina em presença de água e quando preparada no extrato da matriz.

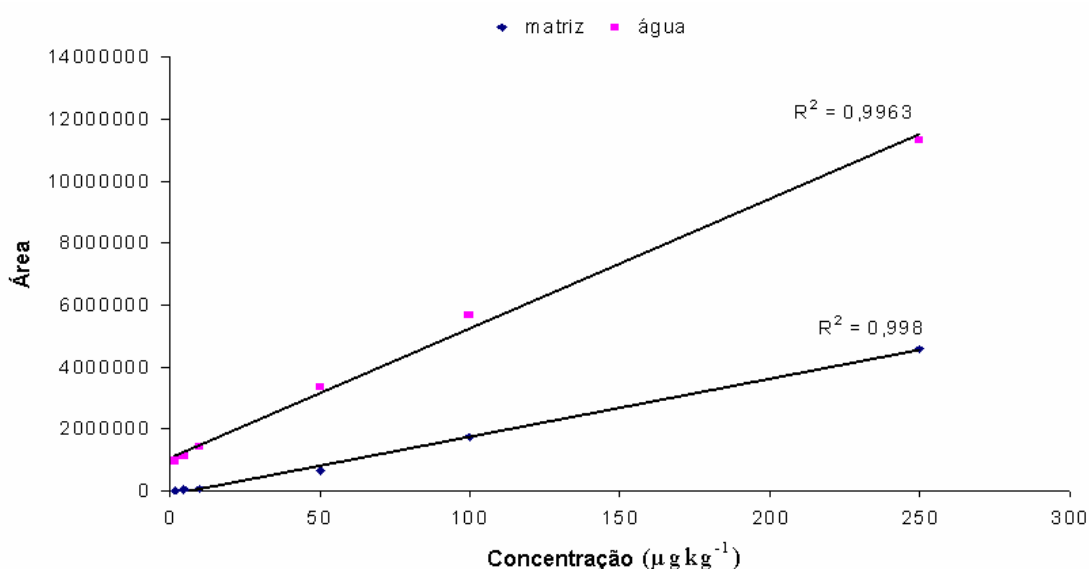


Figura 35. Comparação da resposta analítica da bifentrina obtida por SPME e análise por GC-MS, quando o composto é preparado em água e no extrato da matriz.

5.3. Otimização das condições de extração dos agrotóxicos da matriz manga por SPME para análise por GC-MS.

A etapa de otimização das condições de extração e dessorção envolveram a seleção da fibra, o modo de extração, o tempo e a temperatura de dessorção, o tempo e a temperatura de extração, a velocidade de agitação e o efeito da força iônica por adição de sal e variação do pH. A otimização das variáveis que influenciam na eficiência da extração dos agrotóxicos na manga por SPME e análise por GC-MS foi realizada com os agrotóxicos na presença da matriz. Considerando-se que dez variáveis foram avaliadas, optou-se pelo estudo univariado para uma melhor interpretação química da influência de cada variável.

5.3.1. Seleção da fibra

Os compostos estudados pertencem a diferentes grupos químicos com significativas variações nos valores do coeficiente de partição octanol-água ($\log k_{ow}$) (Tabela 4) que relaciona as propriedades hidrofílicas e lipofílicas de cada pesticida, demonstrando a tendência de afinidade do composto com o meio polar ou apolar. Em função dos compostos terem diferentes polaridades, foram avaliadas fibras com diferentes composições, sendo uma fase polimérica polar (PA 85 μm), uma fase apolar (PDMS 100 μm), duas fases bipolares [(PDMS/DVB 65 μm) e (Carboxen/PDMS 85 μm)] e uma fase trifásica (DVB/Carboxen/PDMS 50 μm) para selecionar a fase que extrai o maior número de compostos com maior eficiência.

Para garantir a extração do maior número de compostos, as extrações foram realizadas com imersão direta. A Figura 36 relaciona o número de compostos extraídos com o tipo de fibra e faz uma comparação entre os resultados das áreas médias dos picos dos analitos obtidas para cada fibra. As fibras contendo Carboxen[®] (DVB/Carb/PDMS e Carb/PDMS) foram menos eficientes na extração do grupo de compostos estudados. A fibra de PDMS apresentou melhor afinidade com os pesticidas extraindo o maior número de compostos. Entretanto, esta fibra também apresentou uma maior afinidade pelos interferentes lipofílicos da matriz, prejudicando a eficiência da extração. Segundo Simplício e Vilas Boas (1999) esta interferência da matriz pode ser minimizada pela diluição do extrato, porém este procedimento provoca uma diminuição na sensibilidade, comprometendo a eficiência na análise. As fibras de

PDMS/DVB e PA comparadas com a de PDMS foram menos eficientes quanto ao número de compostos extraídos, porém foram mais eficientes na quantidade extraída de cada composto. Estas duas fibras apresentaram eficiências similares, sendo que a de PA conseguiu extrair um composto a mais que a de PDMS/DVB e a diferença nas áreas médias obtida não comprometem a sensibilidade do método. Por este motivo a fibra de PA foi selecionada para o desenvolvimento do trabalho. Deve-se ressaltar que qualquer uma das fibras de PA, PDMS e PDMS/DVB pode ser elegível para a análise deste grupo de agrotóxicos na matriz manga.

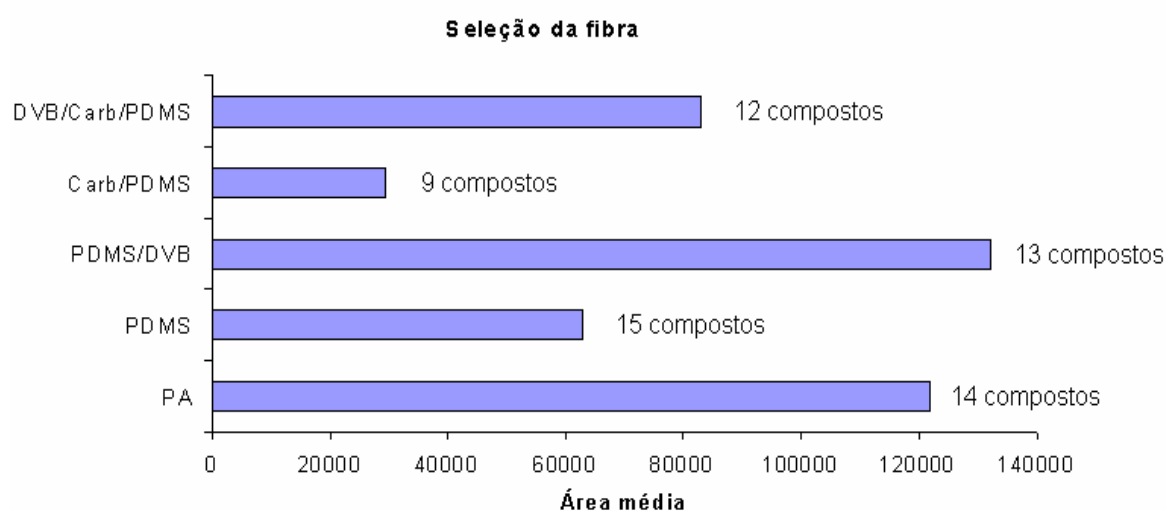


Figura 36. Comparação entre as eficiências de extração das diferentes fibras avaliadas. Extrações realizadas com imersão direta a 60°C por 30 min, com agitação de 300 rpm e com a matriz fortificada (50 µg kg⁻¹). Dessorção a 300°C por 5 min.

5.3.2. Seleção do modo de extração

A microextração em fase sólida pode ser realizada por imersão direta (DI-SPME) ou via *headspace* (HS-SPME). Na extração com imersão direta, a fibra é inserida diretamente na amostra e os analitos são transportados da amostra para a fase sorvente. No modo *headspace*, os analitos são inicialmente volatilizados e estes, na forma de vapor, são transportados para a fase sorvente. Convencionalmente a SPME com imersão direta melhora a eficiência na extração e é aplicada para amostras aquosas limpas. Para matrizes complexas como frutas e vegetais, a extração por *headspace* (HS-SPME) é mais utilizada, principalmente por proteger a fibra de possíveis danos provocados por interferentes que possam ficar retidos de maneira irreversível na sua superfície. No desenvolvimento do método utilizando uma fibra de PA (85

μm) os modos DI-SPME e HS-SPME foram estudados e comparados (Figura 37). Em concordância com Cai *et al.* (2006), extrações no modo *headspace* foram mais eficientes na extração dos compostos mais voláteis como os organofosforados (Parationa metílica, fentiona, malationa e diazinon). Também foi mais eficiente na extração do imazalil, clofentezina e dos piretróides (permetrina e bifentrina). Entretanto, não foram satisfatórias por não conseguir extrair os compostos azoxistrobina, piraclostrobrina, difenoconazol, tiabendazol e procloraz. Com o objetivo de desenvolver uma metodologia que permitisse a determinação simultânea de todos os compostos selecionados para o estudo, a SPME com imersão direta (DI-SPME) foi considerada como mais eficiente por conseguir extrair o maior número de compostos, para o grupo de agrotóxicos estudados.

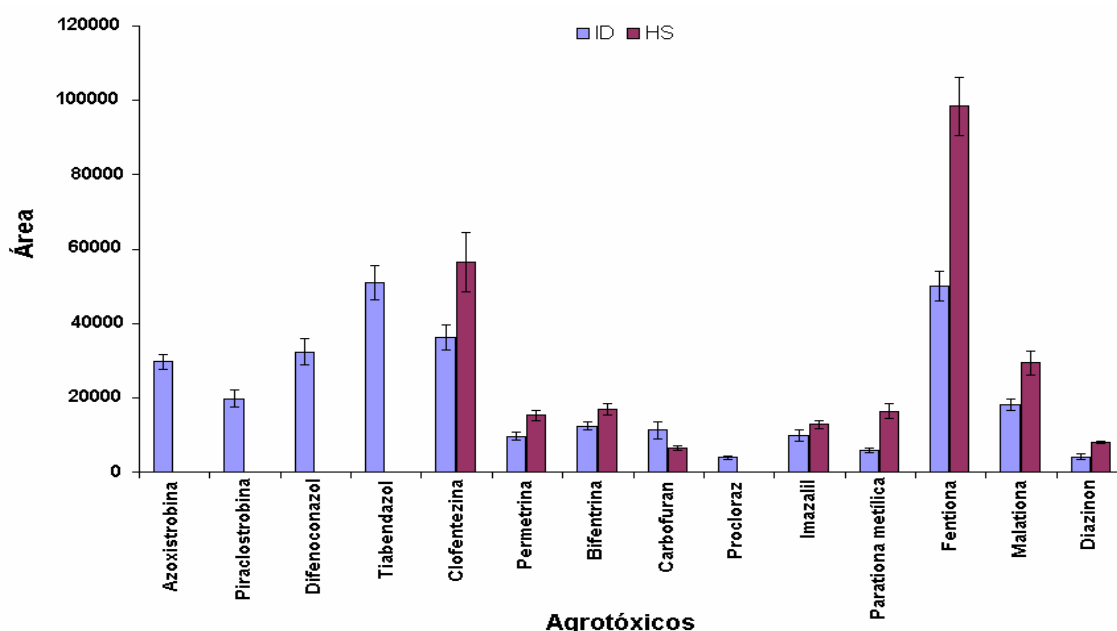


Figura 37. Comparação da eficiência na extração dos agrotóxicos da matriz manga por DI-SPME e HS-SPME (Agrotóxicos em ordem crescente de pressão de vapor). Extrações realizadas com a fibra de PA a 60°C por 30 min, com agitação de 300 rpm e com a matriz fortificada (50 μg kg⁻¹). Dessorção a 300°C por 5 min.

5.3.3. Otimização das condições de dessorção

Os parâmetros de dessorção como a temperatura no injetor do GC e tempo apropriado foram avaliados. A completa dessorção dos analitos aumenta a resposta analítica e elimina o efeito de memória na fibra, evitando a propagação de erros sistemáticos durante o

desenvolvimento da metodologia. Nesta etapa a temperatura do injetor foi ajustada de 250 a 300°C, respeitando a temperatura limite de trabalho da fibra (310°C) indicada pelo seu fabricante. Os resultados revelaram que há um aumento significativo na resposta analítica com o aumento na temperatura de 250°C até 280°C e que não é significativo o aumento na resposta analítica quando a temperatura varia de 280°C a 300°C (Figura 38). Para garantir a completa dessorção dos analitos, também foi otimizado o tempo de dessorção. Foram realizadas dessorções no injetor por 3, 4, 5 e 6 min. Foi observado que 4 min eram suficientes para a completa dessorção dos pesticidas mais voláteis, como clofentezina, carbofuran e os organofosforados. Entretanto a completa dessorção dos piretróides e dos compostos de maior massa molecular só ocorria com dessorções por 5 min (Figura 39). As dessorções realizadas a 280°C por 5 min foram então selecionadas como as condições ótimas para a completa dessorção do grupo de analitos estudados.

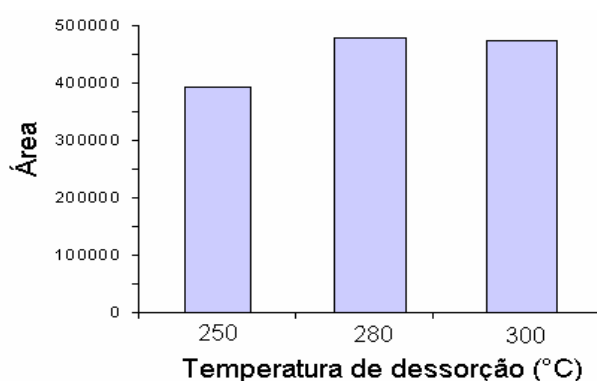


Figura 38. Avaliação da temperatura de dessorção. Extrações realizadas com imersão direta da fibra de PA a 60°C por 30 min, com agitação de 300 rpm e com a matriz fortificada ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$). Dessorção por 5 min.

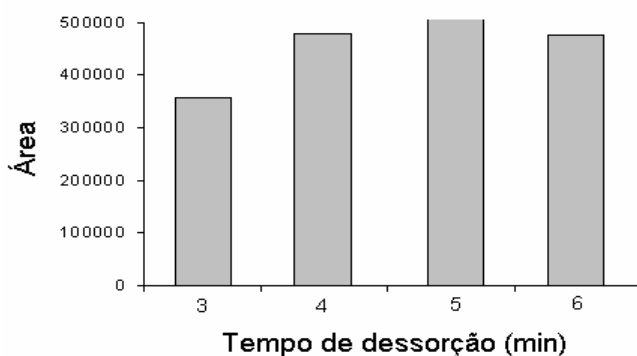


Figura 39. Avaliação do tempo de dessorção. Extrações realizadas com imersão direta da fibra de PA a 60°C por 30 min, com agitação de 300 rpm e com a matriz fortificada ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$). Dessorção a 280°C.

5.3.4. Composição da solução para o preparo do extrato

Tratando-se de uma matriz sólida, foi necessário o preparo de um extrato para a realização da extração dos agrotóxicos por DI-SPME. Este procedimento não reduz drasticamente a sensibilidade do método e apresenta a vantagem de diminuir a interferência da matriz [Cortés-Aguado *et al.*, 2008]. Inicialmente o extrato foi preparado com água, porém observou-se que a presença de uma pequena quantidade de solvente orgânico aumentava a eficiência da extração por diminuir a polaridade do meio, facilitando a transferência dos analitos da matriz para a fase aquosa. Misturas binárias (80:20, v:v) de água:etanol, água:isopropanol e água:acetoneitrila foram avaliadas. A mistura água:etanol foi a que forneceu o extrato mais limpo, ou seja, com menos interferentes provenientes da matriz, entretanto não foi satisfatória com relação a capacidade de transferência dos analitos da matriz para o meio aquoso, sendo menos eficiente na extração dos agrotóxicos. A mistura água:isopropanol foi selecionada para o desenvolvimento do estudo por apresentar os melhores resultados com relação à quantidade de cada composto extraído e por fornecer um extrato relativamente limpo. Sendo assim, a mistura água:isopropanol foi avaliada em diferentes proporções, (90:10; 80:20 e 70:30% v/v) e comparada com água pura (Figura 40). Com a mistura água:isopropanol contendo 20% de isopropanol foram obtidos melhores resultados para oito compostos (diazinon, parationa metílica, malationa, fentiona, imazalil, procloraz, piraclostrobina e difenoconazole). Carbofuran, tiabendazol e azoxistrobina são melhor extraídos em água pura, devido à maior afinidade destes compostos pela água (baixos valores de $\log k_{ow}$), ou seja, a quantidade destes compostos que passa do meio lipofílico (manga) para o meio aquoso é maior, resultando uma maior concentração na fase aquosa e aumentando a eficiência na sua extração pela fibra de poliacrilato (PA). Também, pode-se destacar que a crescente redução da polaridade do meio favoreceu a extração dos piretróides (bifentrina e permetrina), pois estes são os compostos com maior afinidade pelo meio lipofílico (maiores valores de $\log k_{ow}$), dentre os avaliados neste estudo.

A avaliação dos resultados mostrou que a composição isopropanol:água na proporção 20:80 (v/v) é a melhor composição para o preparo do extrato.

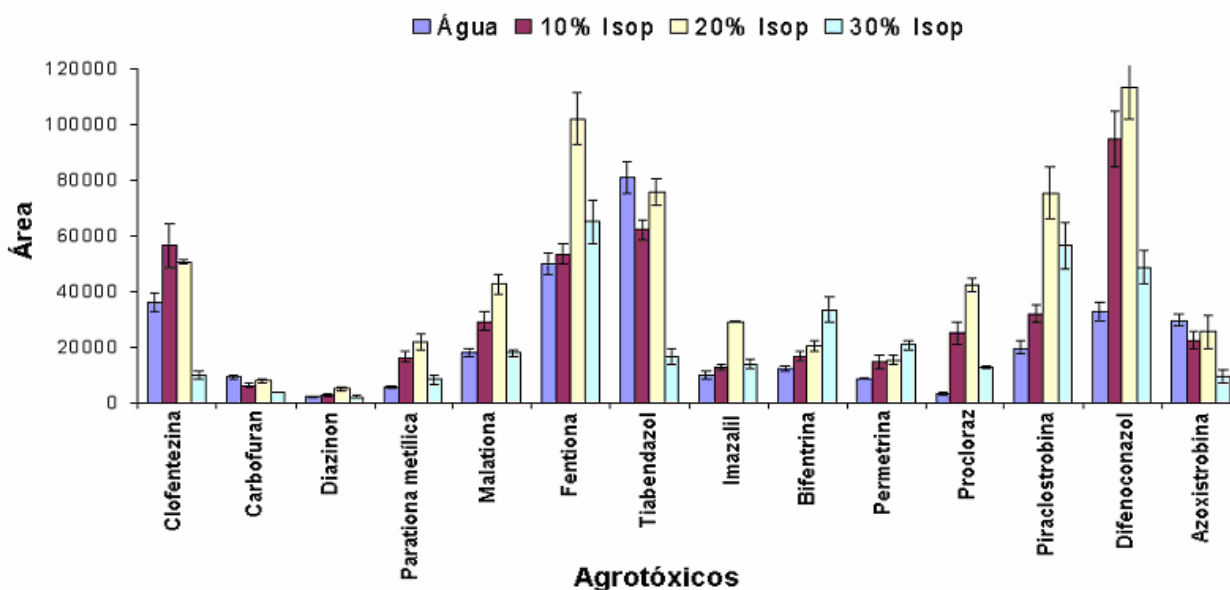


Figura 40. Comparação da eficiência da mistura água:isopropanol em diferentes proporções para a extração dos agrotóxicos por DI-SPME com a fibra de PA a 60°C por 30 min, com agitação de 300 rpm e com a matriz fortificada (50 µg kg⁻¹). Dessorção a 280°C por 5 min.

5.3.5. Estudo do efeito da temperatura de extração

A influência da temperatura na extração foi avaliada realizando extrações a 30, 40, 50 e 60°C. A maioria dos compostos estudados apresentou um aumento na resposta analítica com o aumento da temperatura até 50°C. Temperaturas acima de 50°C favoreceram a volatilização dos organofosforados e provocaram uma diminuição na concentração destes compostos na fase líquida, com a conseqüente redução na eficiência da extração por DI-SPME. Extrações com temperaturas superiores a 40°C favoreceram a decomposição térmica do carbofuran (termicamente instável) provocando uma diminuição na sua resposta analítica. A clofentezina e os piretróides bifentrina ($\log k_{ow} = 7,3$) e permetrina ($\log k_{ow} = 6,1$) apresentaram grande afinidade pela matriz, rica em lipídios. Para estes compostos foi verificado que o aumento da temperatura até 60°C favoreceu a quebra das interações com a matriz, liberando-os para o meio aquoso e aumentando a sua difusão para a fase sólida. Estima-se que em temperaturas superiores é possível diminuir o tempo de difusão dos analitos vindos da matriz para a fibra. Porém, em temperaturas elevadas há uma diminuição na sorção dos analitos na fibra, tendo em vista que esse é geralmente um processo exotérmico [Zeng et al, 2003]. A Figura 41 mostra a

relação entre área dos picos dos agrotóxicos extraídos e a temperatura de extração. Como resultado, foi considerado que as extrações realizadas a 50°C foram mais eficientes proporcionando uma melhor resposta no sinal analítico do maior número de compostos.

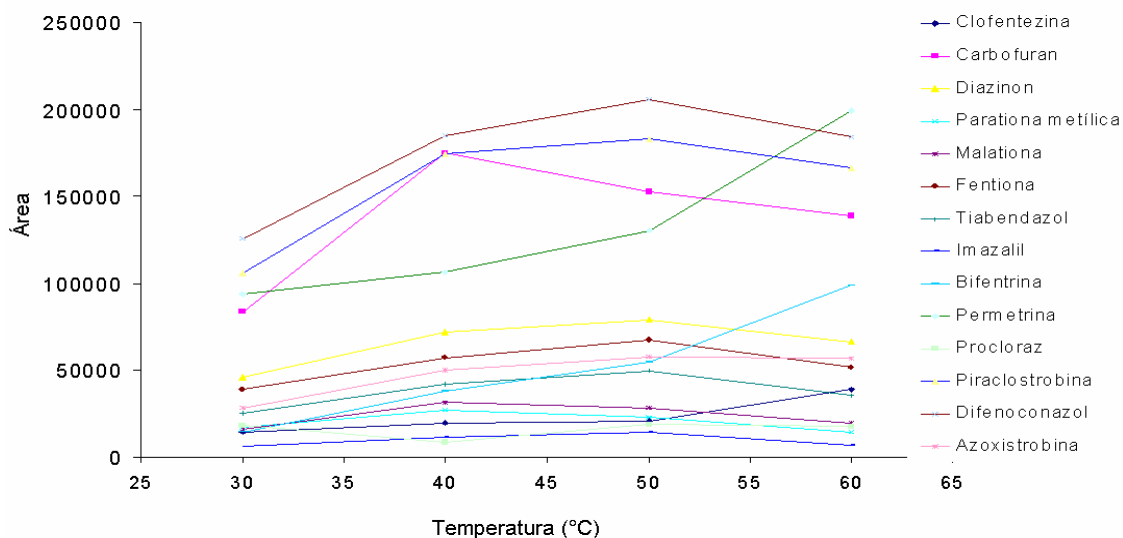


Figura 41. Influência da temperatura na eficiência da extração por DI-SPME com a fibra de PA por 30 min, com agitação de 300 rpm e com a matriz fortificada ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$). Dessorção a 280°C por 5 min.

5.3.6. Avaliação do tempo de extração

O tempo necessário para que os compostos estudados atinjam o equilíbrio entre a fase estacionária na fibra (PA) e a solução contendo a amostra foi avaliado com extrações por DI-SPME a 50°C e tempos de 10, 20, 30 e 40 minutos. Analisando o gráfico da Figura 42, pode-se observar para a maioria dos compostos estudados um aumento da resposta analítica com o aumento do tempo até os 30 min, com exceção da bifentrina, piraclostrobina e clofentezina que tiveram melhores resultados nas extrações com 40 min e o imazalil que apresentou melhores resultados com 20 min, seguido de uma pequena redução na sua resposta analítica em função do aumento no tempo de extração. Na avaliação da influência do tempo na eficiência da extração, pode-se concluir que 30 min é o melhor tempo por fornecer melhores resultados para o maior número de compostos.

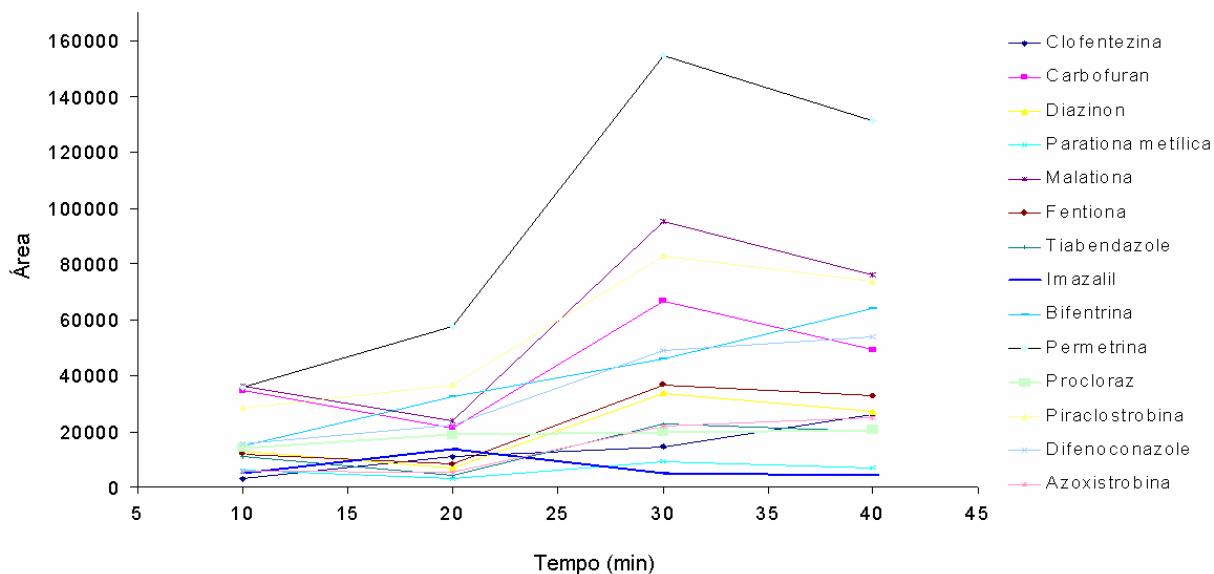


Figura 42. Avaliação da influência do tempo na eficiência da extração dos agrotóxicos em manga por DI-SPME com a fibra de PA a 50°C, com agitação de 300 rpm e com a matriz fortificada (50 µg kg⁻¹). Dessorção a 280°C por 5 min.

5.3.7. Avaliação da velocidade de agitação

A velocidade de agitação no sistema de extração por DI-SPME influi na transferência de massa do meio líquido para a fibra. Na avaliação do efeito da velocidade de agitação foram realizadas extrações por DI-SPME a 50°C por 30 min e agitação de 250, 400 e 600 rpm com limitações à faixa de trabalho de agitação do autoamostrador, que varia de 250 a 700 rpm. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 43. Com exceção da clofentezina, todos os outros agrotóxicos apresentaram diminuição na resposta analítica com o aumento da velocidade de agitação. Em geral, o uso de agitação acelera o processo de extração por SPME, pois a agitação facilita a difusão dos analitos do meio aquoso em direção da superfície da fibra. Entretanto, a técnica de agitação empregada também influi na eficiência da extração [Lanças, 2004]. As extrações foram realizadas no autoamostrador CTC Combi-PAL que apresenta uma forma diferente de agitação, onde a fibra, ao ser imersa na solução aquosa, fica parada, enquanto o vial contendo a amostra fica em movimento. Este modo de agitação provoca uma lavagem da fibra durante a agitação, resultando na redução da eficiência da extração dos analitos em função do aumento da velocidade de agitação. Foi então selecionada a agitação a 250 rpm.

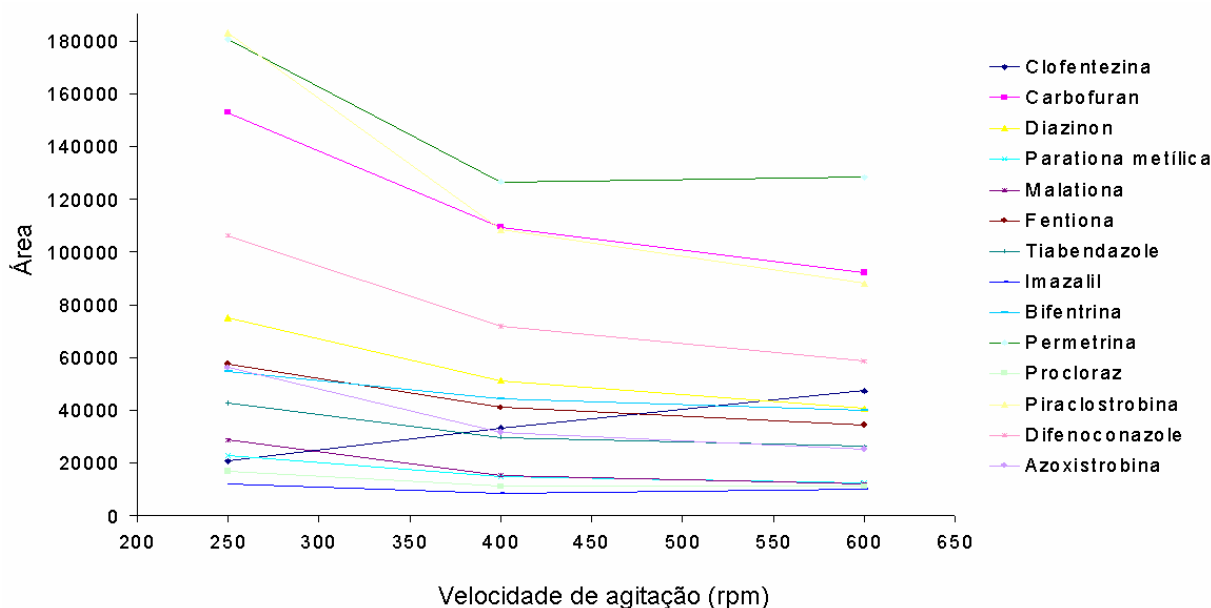


Figura 43. Eficiência de extração em função da velocidade de agitação. Extrações realizadas com imersão direta da fibra de PA a 50°C por 30 min, com a matriz fortificada (50 µg kg⁻¹). Dessorção a 280°C por 5 min.

5.3.8. Efeito da força iônica e da variação de pH

O estudo da influência da força iônica na eficiência da extração foi realizado avaliando o efeito *salting-out* com adição de NaCl e com modificações no pH do meio com adições de soluções diluídas de HCl (ajuste para pH 3) e NaOH (ajuste para pH 8). Estes dois parâmetros foram avaliados, uma vez que em alguns casos apresentaram forte influência na eficiência da extração. Em geral, o aumento da força iônica da solução, diminui a solubilidade de compostos pouco polares ou apolares. Também, aumenta a competição entre analitos e os íons adicionados pelas moléculas de água (usualmente o solvente utilizado). Para avaliar o efeito da força iônica foram realizadas extrações com o extrato preparado com uma solução de isopropanol:água (20/80) sem adição de NaCl, com 5% de NaCl e com 12% de NaCl (m/v). Avaliando os resultados mostrados na Figura 44, podemos observar claramente que a adição de sal é necessária para aumentar a eficiência na extração dos agrotóxicos da matriz em estudo. Com 12% de NaCl foram obtidos melhores resultados para a parationa metílica, malationa, tiabendazole, imazalil e procloraz e resultados equivalentes para a bifentrina e piraclostrobina em comparação com as extrações na presença de NaCl a 5%. Entretanto, com

NaCl a 12% foram observados problemas na repetibilidade dos resultados ($n = 3$) e na estabilidade da solução, com precipitação do sal, quando a solução fica em repouso. A precipitação do sal ocorre devido à presença do isopropanol (20%) na água, a qual provoca uma redução na solubilidade do NaCl no meio. Extrações com 5% de NaCl apresentaram melhores resultados para a clofentezina, carbofuran, diazinon, fentiona, bifentrina, permetrina, difenoconazol e azoxistrobina com melhor repetibilidade nos resultados obtidos. Para a piraclostrobina os resultados obtidos com 5 e 12 % de NaCl foram equivalentes, com diferença apenas na dispersão dos resultados, sendo mais repetitivos com adição de 5% de sal. Desta forma foi considerado que a presença de NaCl na concentração de 5% era mais apropriada para a extração do grupo de agrotóxicos estudados. A Figura 44 mostra a comparação das áreas médias obtidas para cada agrotóxico nas extrações sem adição de sal, com 5% de NaCl e com 12% de NaCl com os respectivos desvios.

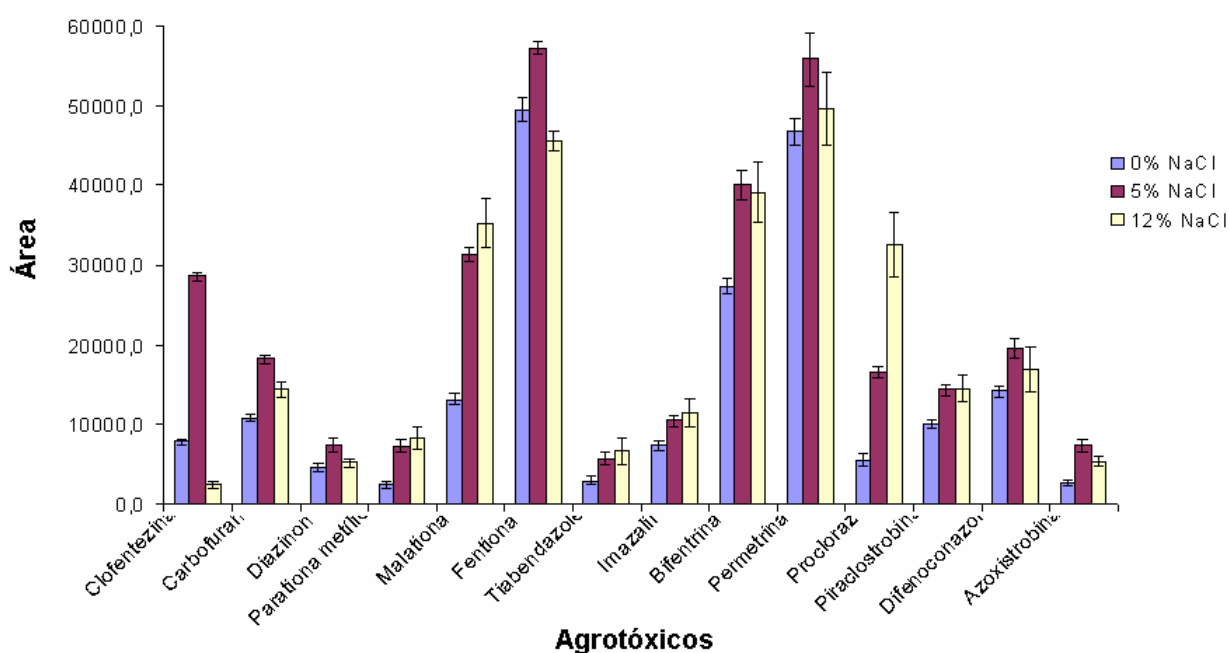


Figura 44. Influência da força iônica na eficiência da extração por adição de NaCl. Extrações realizadas com imersão direta da fibra de PA a 50°C por 30 min, com agitação de 250 rpm e com a matriz fortificada ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$). Dessorção a 280°C por 5 min.

A avaliação do pH do meio é importante para aumentar a eficiência na extração dos agrotóxicos por DI-SPME, pois em meio aquoso o pH afeta o equilíbrio de dissociação de

compostos ionizáveis, como também pode acelerar a velocidade de degradação do agrotóxico. Para avaliar a influência do pH foram realizadas extrações com o extrato preparado com uma solução de isopropanol:água (20/80) contendo 5% de NaCl (m/v), modificando o pH do meio para pH 3, pH 8 e sem adição de ácido ou base (pH 5,5). Ao modificar o pH original ocorreu uma redução na quantidade de clofentezina extraída. Com pH 3 foram obtidos os melhores resultados para a maioria dos compostos. Para os organofosforados (diazinon, parationa metílica, malationa e fentiona) isto se deve ao fato de serem mais estáveis entre pH 3 e 6, sendo rapidamente hidrolisados em meio alcalino, com a consequente redução na concentração destes compostos em pH 8. No ambiente, a principal rota de degradação dos compostos organofosforados é a hidrólise em meio alcalino [Larini, 1981]. O imazalil e os piretróides bifentrina e permetrina apresentaram melhores resultados em meio alcalino. Bifentrina e permetrina são estáveis em pH entre 5 e 9. Em pH 3 são degradados, com a consequente diminuição da concentração em meio aquoso e perda na eficiência da extração. Sendo assim, o pH 3 foi selecionado como o melhor. A Figura 45 mostra a influência do pH na eficiência da extração.

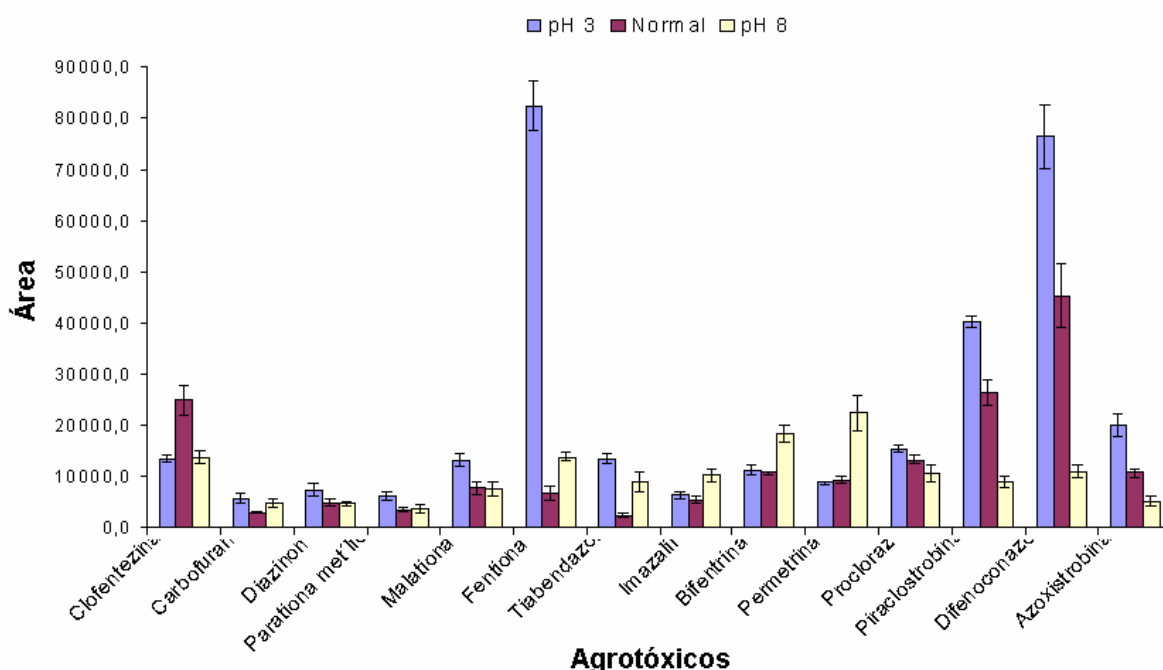


Figura 45. Influência da força iônica na eficiência da extração por ajuste do pH (adição de HCl e NaOH). Extrações realizadas com imersão direta da fibra de PA a 50°C por 30 min, com agitação de 250 rpm e com a matriz fortificada (50 µg kg⁻¹). Dessorção a 280°C por 5 min.

5.3.9. Condições otimizadas para a extração dos agrotóxicos da matriz manga por SPME.

Após a avaliação dos resultados obtidos para cada parâmetro estudado e que tem influência na eficiência da extração dos agrotóxicos da matriz manga por meio da microextração em fase sólida (SPME) e análise por GC-MS, foram estabelecidas as melhores condições de extração e dessorção no sistema de injeção do cromatógrafo a gás, respeitando as peculiaridades de uma matriz vegetal complexa. A Tabela 8 mostra os parâmetros otimizados com os melhores resultados de cada parâmetro avaliado.

Tabela 8. Variáveis otimizadas e seus respectivos valores para a extração dos compostos estudados na matriz manga por meio da SPME e análise por GC-MS.

Parâmetros avaliados	Melhor resultado
Fase de recobrimento da fibra (PA 85 µm, PDMS 100 µm, PDMS/DVB 65 µm, DVB/Carboxen/PDMS 50 µm e Carboxen/PDMS 85 µm)	PA 85 µm
Modo de extração (Imersão direta e <i>headspace</i>)	DI-SPME
Temperatura de dessorção (250, 270, 280 e 300°C)	280°C
Tempo de dessorção (3, 4, 5 e 6 min)	5 min
Composição da solução para o preparo do extrato (80:20 v:v) de água:etanol, água:isopropanol e água:acetonitrila	Água:isopropanol
Temperatura de extração (30, 40, 50 e 60°C)	50°C
Tempo de extração (10, 20, 30 e 40 min)	30 min
Velocidade de agitação (250, 400 e 600 rpm)	250 rpm
Efeito da adição de sal (0, 5 e 12 %)	5 %
Efeito do pH (3, 5,5 e 8)	3

5.4. Determinação de resíduos de agrotóxicos na matriz manga por DI-SPME-GC-MS.

As condições cromatográficas utilizadas na determinação de resíduos dos agrotóxicos clofentezina, carbofuran, diazinon, parationa metílica, malationa, fentiona, tiabendazol, imazalil, bifentrina, permetrina, procloraz, piraclostrobina, difenoconazole e azoxistrobina por DI-SPME e GC-MS estão descritas no item 4.7, e o procedimento de extração no item 4.10.

5.4.1. Validação do método

A validação do método com as condições de extração por DI-SPME otimizadas e análise por GC-MS nas condições cromatográficas estabelecidas, foi realizada com o estudo das faixas de trabalho, linearidade, sensibilidade, limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), precisão intradia e interdia (RSD) e a exatidão pelo estudo da recuperação relativa em diferentes níveis de fortificação e a recuperação absoluta.

5.4.1.1. Curvas analíticas (linearidade) e faixas de trabalho

O método da padronização externa foi aplicado para a quantificação dos agrotóxicos. Após identificar o efeito da matriz, foi preparado um extrato a partir da matriz sem a presença dos agrotóxicos, utilizando o mesmo procedimento de extração descrito no item 4.10. O extrato obtido foi utilizado na preparação das soluções padrão para obter a curva analítica. A curva analítica foi construída com nove pontos correspondendo aos níveis de fortificação de 3,33; 6,66; 16,5; 33,3; 100,0; 166,5; 333,3; 832,5 e 1665,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo cada ponto obtido em triplicata, com os resultados dos desvios-padrão mostrando que a dispersão nas análises foi independente da concentração da amostra. As curvas analíticas obtidas foram utilizadas para o estudo da sensibilidade, exatidão e precisão do método proposto. A Tabela 9 mostra as equações das retas obtidas por regressão linear, os coeficientes de determinação (R^2), a faixa linear de trabalho de cada composto e os valores dos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pela ANVISA [2009].

Tabela 9. Equações por regressão linear, coeficientes de determinação (R^2) e faixa linear de trabalho obtidos na análise por DI-SPME-GC-MS e LMR.

Agrotóxico	Equação por regressão linear	R^2	Faixa linear de trabalho ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR* ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Clofentezina	$2061,5x + 60577$	0,9967	3,33 – 1665,0	-
Carbofuran	$42,5x - 1295,4$	0,9906	33,33 – 1665,0	-
Diazinon	$39,5x - 5,2$	0,9987	16,65 – 1665,0	-
Parationa metflica	$453,7x - 12124$	0,9960	16,65 – 1665,0	-
Malationa	$395,6x - 22928$	0,9907	6,66 – 1665,0	-
Fentiona	$3917,3x + 165795$	0,9966	3,33 – 1665,0	50
Tiabendazol	$267,4x + 17590$	0,9948	33,33 – 1665,0	2000
Imazalil	$114,6x - 3382,2$	0,9980	33,33 – 1665,0	1000
Bifentrina	$6792,7x - 286761$	0,9973	6,66 – 1665,0	100
Permetrina	$1537,1x - 106775$	0,9903	16,65 – 1665,0	-
Procloraz	$335,8x - 852,1$	0,9960	6,66 – 1665,0	200
Piraclostrobina	$1689,8x + 4841,3$	0,9991	16,65 – 1665,0	100
Difenoconazol	$4357,3x + 29790$	0,9986	3,33 – 1665,0	200
Azoxistrobina	$1857,0x - 19938$	0,9929	6,66 – 1665,0	500

*Fonte: ANVISA, 2009.

As equações obtidas apresentaram boa linearidade com coeficientes de determinação variando entre 0,9906 (Carbofuran) e 0,9991 (Piraclostrobina). O método desenvolvido apresenta ampla faixa linear de trabalho que contempla os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com valores mínimos entre 3,33 e 33,33 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e máximo de 1665,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Uma exceção foi com relação ao tiabendazol, cujo LMR (2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) é maior que o último ponto da curva analítica. Os compostos clofentezina, carbofuran, diazinon, parationa metflica, malationa e permetrina, por não serem autorizados para o cultivo da manga, não apresenta valores de LMR.

5.4.1.2. Sensibilidade

Este parâmetro de validação demonstra a capacidade que o método analítico tem de distinguir com confiança duas concentrações próximas. A sensibilidade varia de um analito para outro em função da eficiência do método de extração, da própria natureza do analito e do

sistema de detecção. Na espectrometria de massas no modo SIM, quanto mais estável um íon formado, maior sua intensidade relativa, para uma boa sensibilidade. A sensibilidade é expressa pela inclinação da reta, obtida por regressão linear no estudo da linearidade. A sensibilidade foi calculada pela relação $S = dx/dc$, onde S é a sensibilidade, dx é a variação da resposta analítica e dc é a variação da concentração. A sensibilidade foi avaliada para um intervalo de concentração de 33,3 a 1665,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A Tabela 10 mostra os valores obtidos para S no intervalo de concentração estabelecido.

Tabela 10. Estudo da sensibilidade do método desenvolvido no intervalo de 33,3 a 1665,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Agrotóxicos	S	Agrotóxicos	S
Clofentezina	2061,5	Imazalil	114,6
Carbofuran	42,5	Bifentrina	6792,7
Diazinon	39,5	Permetrina	1537,1
Parationa metílica	453,7	Procloraz	335,8
Malationa	395,6	Piraclostrobina	1689,8
Fentiona	3917,3	Difenoconazol	4357,3
Tiabendazol	267,4	Azoxistrobina	1857,0

Como pode ser observado na Tabela 10, os valores obtidos para S variaram de 39,5 (diazinona) a 6792,7 (bifentrina), ou seja, a sensibilidade para a bifentrina é 168 vezes maior que a sensibilidade para o diazinon. A bifentrina e a fentiona são os compostos que apresentam maior sensibilidade, isto se deve ao fato de que na ionização por impacto de elétrons estes compostos apresentam íons estáveis e de grande intensidade, que são selecionados como os íons de quantificação (fentiona 278 m/z e bifentrina 181 m/z) favorecendo as suas respostas analíticas na quantificação.

5.4.1.3. Limites de detecção (LOD) e Limites de quantificação (LOQ)

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos em conjunto com o estudo da faixa linear de trabalho na construção da curva analítica, estando os agrotóxicos em presença do extrato da matriz. Foram realizadas extrações sucessivas por DI-SPME, diminuindo a concentração dos agrotóxicos até perder a proporcionalidade entre a concentração e a resposta analítica do detector. A menor concentração do analito que pode ser

detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas constitui o limite de detecção [Currie, 1999]. Os LOD e LOQ foram estabelecidos utilizando a razão sinal/ruído de cada analito, obtidas com extrações dos analitos no extrato da matriz, quando ainda era obtido um sinal mínimo e mensurável de cada analito. A relação de 3:1 foi estimada como limite de detecção e a razão de 10:1 foi estabelecida como limite de quantificação. O menor nível de concentração na curva analítica corresponde ao início da faixa linear de trabalho e ao LOQ para cada composto.

Os LOD e LOQ obtidos variaram entre 1,00 e 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e entre 3,33 e 33,33 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Dos compostos estudados apenas a fentiona, tiabendazol, imazalil, bifentrina, procloraz, piraclostrobina, difenoconazol e azoxistrobina são autorizados pela legislação brasileira para aplicações no cultivo da manga e os LOQ obtidos para estes agrotóxicos são menores que os LMR estabelecidos. Para a fentiona que possui o menor LMR, foi obtido um LOQ quinze vezes menor ao valor estabelecido pela legislação, mostrando que o método apresenta sensibilidade adequada para a sua aplicação. Os limites de detecção e de quantificação obtidos pelo método proposto são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11. Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) obtidos com o método desenvolvido por DI-SPME e GC-MS e LMR.

Agrotóxicos	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR* ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Agrotóxicos	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR* ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Clofentezina	1,00	3,33	-	Imazalil	10,00	33,33	1000
Carbofuran	10,00	33,33	-	Bifentrina	2,00	6,66	100
Diazinon	5,00	16,65	-	Permetrina	5,00	16,65	-
Parationa metílica	5,00	16,65	-	Procloraz	2,00	6,66	200
Malationa	2,00	6,66	-	Piraclostrobina	5,00	16,65	100
Fentiona	1,00	3,33	50	Difenoconazole	1,00	3,33	200
Thiabendazole	10,00	33,33	2000	Azoxistrobina	1,00	6,66	500

*Fonte: ANVISA, 2009.

5.4.1.4. Precisão do método

A precisão do método foi avaliada com o estudo da repetibilidade, realizando-se sete extrações no mesmo dia (precisão intradia) e durante cinco dias consecutivos, efetuando-se três extrações em cada dia (precisão interdias ou precisão intermediária). O estudo da precisão intradia apresentou coeficientes de variação satisfatórios com valores menores que 15 % [Ribani et al, 2004], com exceção do tiabendazol que teve variação de 17,0 %. O tiabendazol ($\log k_{ow} = 2,39$), por ser polar, apresenta grande afinidade pela fase sólida de poliacrilato e a sua dessorção térmica no injetor é gradativa, provocando a formação de uma cauda no seu pico, que ocasiona problemas na sua integração. No estudo da precisão interdias foram obtidos valores do CV variando entre 7,0 % e 22,0 % para a fentiona e imazalil, respectivamente. Estes valores estão em acordo com os critérios de validação descritos por Ribani *et al.*, (2004) que estabelecem CV de até 20% para análises de traços, dependendo da complexidade da amostra. Os valores dos CV (%) obtidos no estudo da precisão com nível de fortificação de $50,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12. Coeficientes de variação obtidos no estudo da precisão do método desenvolvido por DI-SPME e GC-MS.

Agrotóxicos	C.V (%), nível de fortificação ($50,0 \mu\text{g kg}^{-1}$)	
	Intradia (n = 7)	Interdias (n = 15)
Clofentezina	7,4	9,1
Carbofuran	5,8	12,1
Diazinon	4,0	13,7
Parationa metílica	6,7	11,5
Malationa	10,9	12,9
Fentiona	8,3	7,0
Tiabendazol	17,0	19,9
Imazalil	12,5	22,0
Bifentrina	5,8	13,3
Permetrina	10,1	13,6
Procloraz	8,4	10,3
Piraclostrobina	7,5	12,7
Difenoconazol	7,6	9,3
Azoxistrobina	6,6	12,0

5.4.1.5. Exatidão do método

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada realizando-se o estudo das recuperações relativa e absoluta. As recuperações relativas foram avaliadas em três níveis de fortificação (33,3; 166,5 e 333,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$), onde o menor nível de fortificação (33,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$) corresponde aos LOQ do carbofuran, tiabendazol e imazalil. Neste nível, as recuperações apresentaram variação de 71,6 % a 117,5 % com desvio-padrão relativo variando entre 3,1 % e 12,0 %. No nível intermediário (166,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$) as recuperações apresentaram variação de 67,5% a 95,0% com desvio-padrão relativo variando entre 7,8% e 15,6%. No maior nível (333,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$) as recuperações variaram entre 52,2 % e 86,0 % com desvio-padrão relativo variando entre 2,8 % e 10,6 %. Observam-se melhores resultados na recuperação em concentrações menores. Este fato já foi mencionado na literatura por Simplício & Vilas Boas (1999), onde é descrito que em soluções mais diluídas o agrotóxico interage menos com constituintes da matriz, permanecendo disponíveis para serem sorvidos na fase sólida e proporcionar melhores recuperações. Também, possivelmente com concentrações maiores dos agrotóxicos ocorra uma diminuição na capacidade de sorção dos agrotóxicos pela fibra, provocada pela saturação da mesma. A Tabela 13 mostra os resultados das recuperações relativas obtidas em diferentes concentrações.

Como o espectrômetro de massas é sensível à massa do analito, a recuperação absoluta foi avaliada por comparação entre as áreas obtidas ($n = 3$) com injeções diretas de 2 μL de uma mistura-padrão de concentração 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e as áreas obtidas ($n = 3$) nas extrações dos pesticidas por DI-SPME em amostras de manga fortificadas com 2 μL da mesma mistura-padrão de concentração 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, avaliando-se assim as respostas do detector para a mesma massa de cada pesticida. A SPME, por ser uma técnica de extração não exaustiva, proporciona recuperações diretas usualmente menores que 30% [Picó *et al.*, 2007]. Melhores resultados na recuperação direta podem ser alcançados realizando extrações em recipientes menores, mantendo a mesma concentração dos analitos. A Tabela 14 mostra os valores das recuperações absolutas obtidas com o método desenvolvido.

Tabela 13. Recuperações relativas e RSD(%) em diferentes níveis de fortificação.

Agrotóxicos	Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação média (%) (n = 3)	RSD (%)
Clofentezina	33,3	89,63	7,8
	166,5	71,9	3,8
	333,3	52,8	3,1
Carbofuran	33,3	89,3	12,4
	166,5	83,9	4,5
	333,3	77,3	6,6
Diazinon	33,3	117,5	12,3
	166,5	89,5	4,6
	333,3	77,3	6,7
Parationa metílica	33,3	91,8	7,6
	166,5	82,0	6,7
	333,3	68,9	3,7
Malationa	33,3	83,9	4,8
	166,5	75,3	5,7
	333,3	72,0	6,0
Fentiona	33,3	75,8	5,9
	166,5	72,4	4,1
	333,3	52,2	3,9
Tiabendazol	33,3	90,0	10,8
	166,5	95,0	15,6
	333,3	78,5	5,8
Imazalil	33,3	102,3	11,6
	166,5	94,6	15,9
	333,3	72,5	5,8
Bifentrina	33,3	71,6	5,6
	166,5	67,5	7,8
	333,3	59,6	3,8
Permethrin	33,3	80,8	3,1
	166,5	82,2	8,2
	333,3	86,0	6,7
Procloraz	33,3	108,7	5,9
	166,5	80,7	4,5
	333,3	82,6	10,6
Piraclostrobina	33,3	115,9	10,0
	166,5	74,2	3,5
	333,3	77,1	2,9
Difenoconazol	33,3	110,9	8,6
	166,5	79,3	4,6
	333,3	81,3	4,8
Azoxistrobina	33,3	84,7	7,3
	166,5	82,7	5,1
	333,3	80,0	4,7

Tabela 14. Recuperação absoluta e RSD (%)

Agrotóxicos	Recuperação absoluta (%) e RSD (%) (n =3)
Clofentezina	4,07 ± 0,25
Carbofuran	5,26 ± 0,48
Diazinon	0,83 ± 0,05
Parationa metílica	2,40 ± 0,15
Malationa	3,54 ± 0,13
Fentiona	3,84 ± 0,24
Tiabendazol	9,72 ± 1,32
Imazalil	1,09 ± 0,05
Bifentrina	1,67 ± 0,09
Permetrina	1,62 ± 0,15
Procloraz	1,55 ± 0,10
Piraclostrobina	12,36 ± 1,17
Difenoconazol	17,83 ± 0,90
Azoxistrobina	16,08 ± 1,36

Os valores variaram entre $0,83 \pm 0,05$ % para o diazinon e $17,83 \pm 0,90$ % para o difenoconazol, com coeficientes de variação entre 3,70 % e 13,62 % para o malation e tiabendazol, respectivamente. A extração por imersão direta proporcionou melhores resultados para os compostos menos voláteis, como difenoconazol e azoxistrobina. Os organofosforados apresentaram recuperações entre 0,83 e 3,84%, possivelmente devido à volatilização que ocorre ao longo da extração realizada a 50°C, diminuindo a concentração destes compostos na fase aquosa. Os piretróides bifentrina ($\log k_{ow} = 7,30$) e permetrina ($\log k_{ow} = 6,10$) apresentaram recuperações baixas com valores de 1,67 e 1,62 %, respectivamente. Isto se deve, provavelmente a sua grande afinidade pela matriz, que é rica em lipídios.

5.4.2. Aplicação da metodologia desenvolvida por DI-SPME e GC-MS na análise de resíduos de agrotóxicos em amostras comerciais.

Para testar a aplicabilidade do método proposto na análise de amostras reais, o método desenvolvido foi utilizado para determinar resíduos de agrotóxicos em dezesseis amostras de manga cultivadas com os métodos agrícolas convencionais. No momento da coleta foi observado o fornecedor do produto para identificar a origem da região produtora, sendo observado que as mangas comercializadas na cidade de Salvador são produzidas na região do Vale do São Francisco que contempla os projetos irrigados de Juazeiro/BA e Petrolina/PE. As amostras foram adquiridas em diferentes pontos comerciais na cidade de Salvador, BA, no período de agosto e setembro de 2008 e janeiro de 2009 e imediatamente processadas seguindo o procedimento descrito no item 4.10. As amostras foram analisadas em triplicata e entre as análises de cada amostra foi sempre realizado um branco da fibra para evitar o efeito de memória e garantir a exatidão das medidas. A Tabela 15 mostra os resultados obtidos com os respectivos desvios-padrão para cada análise. Em sete amostras foram detectados resíduos de carbofuran e permetrina com concentrações entre 54,0 e 93,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 69,4 e 104,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Em seis amostras foram detectados resíduos de parationa com concentração entre 31,9 e 57,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$, em três amostras foram detectados resíduos de malationa com concentração média de 46,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e em seis amostras foram detectados resíduos de tiabendazol com concentração média de 44,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Em todas as amostras foram detectados resíduos de bifentrina e azoxistrobina com concentrações entre 18,3 e 57,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 12,6 e 55,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Para os agrotóxicos autorizados para uso no cultivo da manga, as concentrações encontradas estavam abaixo dos LMR estabelecidos pela legislação brasileira. Entretanto, não existem parâmetros para avaliar os valores encontrados de carbofuran, parationa metílica, malationa e permetrina, pois estes agrotóxicos não são liberados para serem aplicados no cultivo dessa fruta.

É importante ressaltar que mesmo as concentrações encontradas estando abaixo dos LMR, o somatório de todas as concentrações é preocupante. Por exemplo, na amostra 1 onde foram detectados resíduos de carbofuran, parationa metílica, malationa, fentiona, bifentrina, permetrina, procloraz e azoxistrobina, o somatório das concentrações chegou a 412,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabela 15. Resultados obtidos e desvio-padrão das análises por DI-SPME e GC-MS das amostras comerciais.

Agrotóxicos	Média das concentrações encontradas, $\mu\text{g kg}^{-1}$ (RSD, %, n = 3)																LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Clofentezina	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	-
Carbofuran	93,3 (4,3)	74,3 (3,8)	64,2 (3,4)	n.d	62,3 (3,6)	n.d	n.d	68,5 (4,7)	n.d	54,0 (3,4)	n.d	75,4 (4,7)	n.d	n.d	n.d	n.d	-
Diazinon	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	-
Parationa metflica	43,1 (3,7)	40,8 (4,8)	n.d	n.d	37,4 (4,2)	n.d	n.d	31,9 (2,7)	n.d	41,8 (3,4)	n.d	57,9 (4,2)	n.d	n.d	n.d	n.d	-
Malationa	47,9 (2,2)	n.d	43,6 (3,0)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	48,6 (4,0)	n.d	n.d	n.d	n.d	-
Fentiona	4,4 (0,8)	3,8 (0,6)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	6,9 (1,0)	n.d	n.d	n.d	50
Tiabendazol	n.d	42,9 (5,4)	47,7 (4,2)	n.d	42,6 (3,8)	n.d	n.d	43,0 (6,0)	n.d	46,6 (4,0)	n.d	43,2 (5,1)	n.d	n.d	n.d	n.d	2000
Imazalil	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1000
Bifentrina	42,8 (2,3)	39,9 (3,7)	34,9 (4,6)	54,6 (4,2)	41,6 (6,0)	38,5 (3,0)	57,3 (3,9)	43,0 (4,7)	48,0 (3,5)	42,5 (2,9)	29,7 (2,6)	40,2 (3,6)	26,7 (3,2)	37,4 (4,6)	18,3 (2,8)	37,6 (4,3)	100
Permetrina	104,9 (8,3)	77,1 (6,3)	81,4 (4,4)	n.d	76,6 (3,7)	n.d	n.d	78,0 (4,0)	n.d	69,5 (3,7)	n.d	80,4 (4,7)	n.d	n.d	n.d	n.d	-
Procloraz	38,4 (4,3)	38,0 (2,7)	18,3 (2,3)	21,4 (3,4)	19,4 (1,9)	n.d	n.d	28,3 (2,6)	21,3 (2,5)	23,0 (2,2)	34,8 (3,6)	n.d	n.d	n.d	n.d	19,7 (3,7)	200
Piraclostrobina	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	100
Difenoconazol	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	200
Azoxistrobina	37,8 (2,4)	39,8 (3,6)	45,9 (4,2)	35,6 (3,4)	55,8 (4,3)	16,3 (1,0)	24,6 (1,8)	48,4 (3,7)	23,9 (2,0)	37,7 (3,1)	14,4 (2,3)	52,2 (3,6)	18,6 (2,0)	12,7 (1,9)	19,6 (1,0)	27,9 (2,4)	500
Somatório ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	412,6	356,6	336,0	111,6	336,7	54,8	81,9	341,1	93,2	315,1	78,9	397,9	52,2	50,1	37,9	85,2	

n.d = não detectado

5.5. Determinação de resíduos de agrotóxicos na matriz manga por DI-SPME-HPLC-UV-Vis.

Entre os agrotóxicos selecionados para o estudo, está a abamectina que é uma substância de massa molecular 866,6u. Esta substância apresenta temperatura de fusão igual a 166,5°C e decompõe-se antes de atingir a ebulição [IUPAC, 2009]. Portanto, trata-se de uma molécula que não se adequa a análise por cromatografia a gás, sendo necessário o desenvolvimento de uma metodologia por cromatografia líquida para a sua determinação. Algumas metodologias para análise de resíduos de abamectina em frutas são descritas na literatura [Diserens & Henzelin (1999), Hernández-Borges *et al.*, (2007)]. Entretanto, estas metodologias foram desenvolvidas para a análise da abamectina sozinha ou em conjunto com outras substâncias do grupo das avemectinas, envolvendo uma etapa de derivatização com ácido tricloroacético ou com 1-metil-imidazole. Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia que não faz uso da etapa de derivatização e que permite a análise em conjunto com compostos de diferentes grupos químicos, tais como tiabendazol e procloraz (imidazóis), carbofuran e carbosulfan (carbamatos), permetrina e bifentrina (piretróides), clofentezina (tetrazina), fentiona (organofosforado) e azoxistrobina (estrobilurina).

5.5.1. Otimização das condições cromatográficas para as análises por HPLC-UV-Vis.

Na otimização das condições para as análises por HPLC-UV-Vis, inicialmente foi observado o espectro de absorção de cada composto na região UV-Vis para selecionar o melhor comprimento de onda de cada um deles. A otimização dos tempos de retenção foi realizada com injeção de 20,0 µL de soluções-padrão de cada agrotóxico nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg L⁻¹. Após a identificação do tempo de retenção de cada composto foi avaliada a resolução na separação dos dez compostos presentes em uma mistura, efetuando-se injeções de 20,0 µL de uma mistura padrão de concentração 1,0 mg L⁻¹. As condições cromatográficas utilizadas na determinação de resíduos dos agrotóxicos tiabendazol, carbofuran, azoxistrobina, procloraz, fentiona, clofentezina, permetrina, abamectina, carbosulfan e bifentrina por DI-SPME e HPLC-UV-Vis estão descritas no item 4.8.

A Figura 46 mostra a separação dos agrotóxicos obtida no sistema HPLC-UV-Vis com uma boa resolução, após extração por DI-SPME em uma amostra fortificada a $250 \mu\text{g kg}^{-1}$.

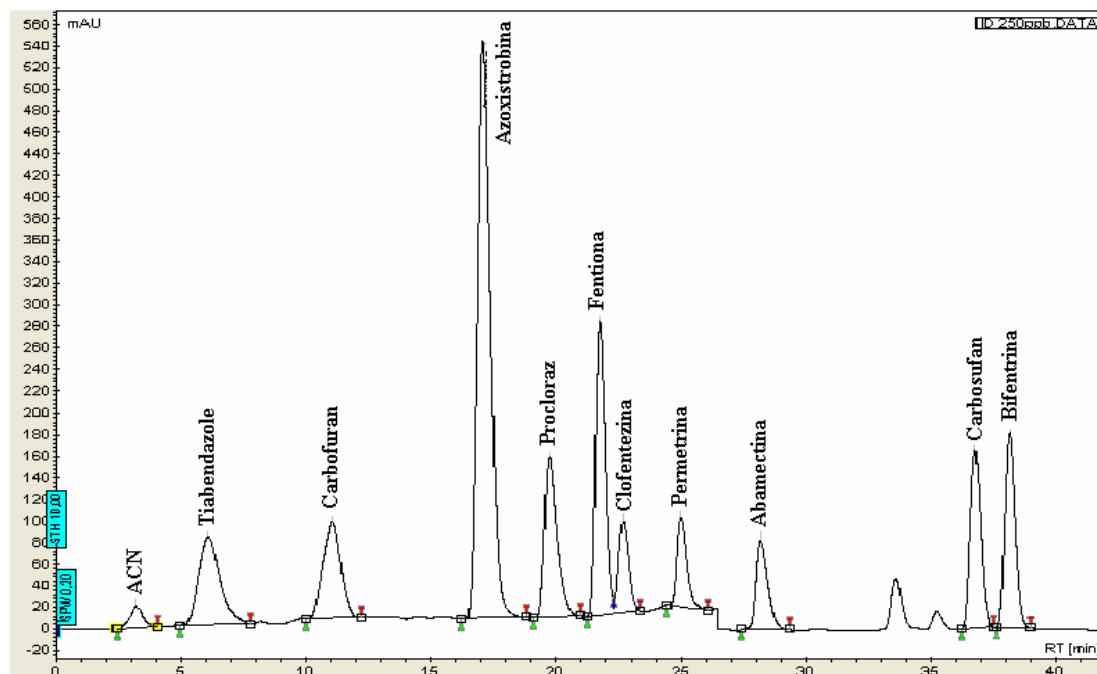


Figura 46. Cromatograma obtido por DI-SPME-HPLC-UV-Vis com fortificação da matriz a $250 \mu\text{g kg}^{-1}$. Coluna de fase reversa XTerra® MS C₁₈ 5 μm (250 mm x 2.1 mm), fase móvel água (A) e acetonitrila (B), 30% de B (início), 70% de B (6 min), 80% de B (18 min), 100% de B (22 - 32 min), 30% de B (35 - 42 min), fluxo de $0,25 \text{ mL min}^{-1}$. O detector UV-Vis operou em 203 nm (0 – 26,5 e 31- 42 min) e em 245 nm (26,5 – 31 min).

5.5.2. Adaptação para a extração dos agrotóxicos: Mudança de fibra

Na etapa de seleção da fibra (discussão do item 5.3.1) a abamectina não fazia parte do elenco de agrotóxicos utilizados para a otimização das condições de extração, pois esta etapa foi realizada por GC-MS e a abamectina não é analisada por cromatografia gasosa. Nesta etapa também foi observado que a única fase de recobrimento que conseguiu extrair o carbosulfan foi o polidimetilsiloxano (PDMS 100 μm). Sendo assim, para realizar a extração dos agrotóxicos incluindo carbosulfan e abamectina, a fibra de PDMS foi novamente testada e comparada com a fibra de PA (85 μm), sendo confirmada a sua eficiência na extração do carbosulfan e também os melhores resultados na extração da

abamectina. Sendo assim, as extrações por DI-SPME visando a análise por HPLC-UV-Vis foram efetuadas com a fibra de PDMS (100 μ m).

5.5.3. Otimização da dessorção na interface de acoplamento SPME-HPLC

A otimização das condições de dessorção dos agrotóxicos na interface de acoplamento SPME-HPLC foi realizada avaliando-se inicialmente qual o melhor modo de dessorção (dinâmico ou estático) e em seguida o tempo de dessorção.

5.5.3.1. Avaliação do modo de dessorção

O estudo de avaliação do modo de dessorção foi realizado efetuando-se inicialmente as dessorções no modo dinâmico, com a fibra inserida na câmara da interface, com a passagem da fase móvel pela câmara durante 15 min, para garantir a completa dessorção dos agrotóxicos. Com este procedimento não foi conseguido o êxito desejado, pois ocorreu a saturação do detector UV-Vis, como pode ser observado na Figura 47 que mostra um cromatograma obtido a partir da dessorção com o procedimento acima descrito.

A extração dos agrotóxicos da manga por DI-SPME também extrai compostos da matriz, tais como carboidratos (discussão no item 5.7), que são interferentes. Neste modo de dessorção, estes interferentes são arrastados pela fase móvel, passando pela coluna cromatográfica, e ao chegarem no detector provocam a sua saturação, inviabilizando a análise química. Para tentar resolver este problema foi modificada a programação do detector no intervalo de 8 a 13 min, para 500 nm, na tentativa de eliminar a interferência. Entretanto, não foi obtido êxito com este novo procedimento. Foram então realizadas dessorções no modo estático, preenchendo a câmara da interface com ACN. A dessorção estática foi efetuada com a fibra inserida na câmara durante 10 min, sendo em seguida removida para a posterior eluição do extrato contido na câmara com a passagem da fase móvel. A Figura 48 mostra o cromatograma obtido nos testes iniciais com a dessorção estática. Como os resultados obtidos foram comparativamente melhores, este modo de dessorção foi escolhido para o desenvolvimento do método.

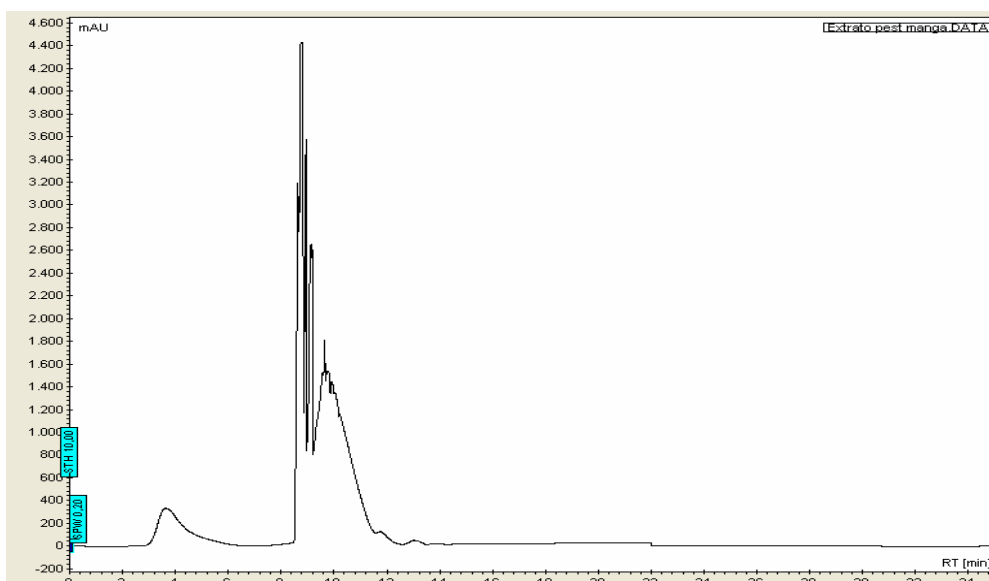


Figura 47. Cromatograma obtido a partir da dessorção dinâmica na interface SPME-HPLC. Coluna de fase reversa XTerra® MS C₁₈ 5 µm (250 mm x 2.1 mm), fase móvel água (A) e acetonitrila (B), 30% de B (início), 70% de B (6 min), 80% de B (18 min), 100% de B (22 - 32 min), 30% de B (35 - 42 min), fluxo de 0,25 mL min⁻¹. O detector UV-Vis operou em 203 nm (0 - 26,5 e 31- 42 min) e em 245 nm (26,5 - 31 min).

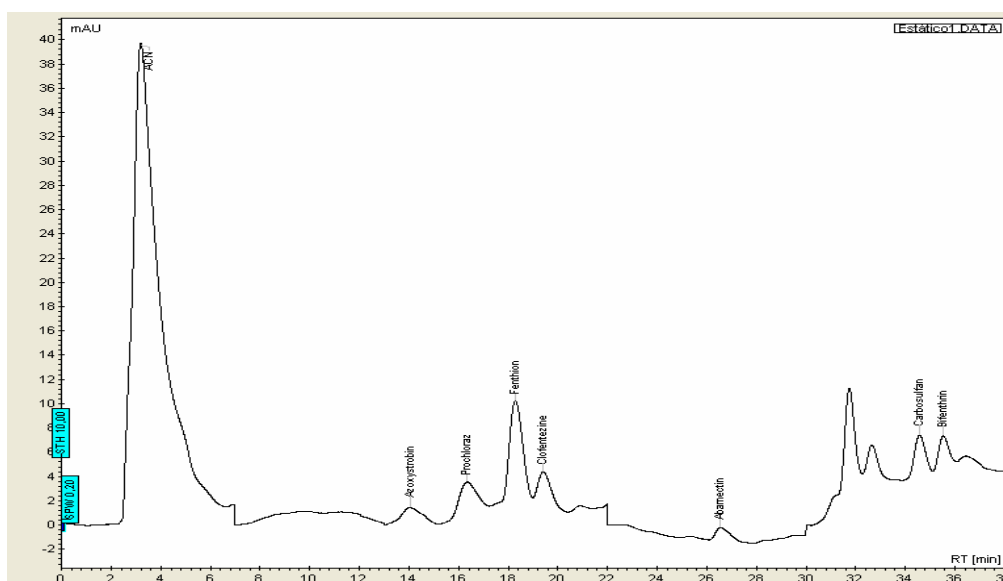


Figura 48. Cromatograma obtido a partir da dessorção estática (ACN) na interface SPME-HPLC. Coluna de fase reversa XTerra® MS C₁₈ 5 µm (250 mm x 2.1 mm), fase móvel água (A) e acetonitrila (B), 30% de B (início), 70% de B (6 min), 80% de B (18 min), 100% de B (22 - 32 min), 30% de B (35 - 42 min), fluxo de 0,25 mL min⁻¹. O detector UV-Vis operou em 203 nm (0 - 26,5 e 31- 42 min) e em 245 nm (26,5 - 31 min).

5.5.3.2. Avaliação do tempo de dessorção

O tempo de dessorção na interface de acoplamento SPME-HPLC foi avaliado com o objetivo de obter um maior sinal na resposta analítica dos agrotóxicos, para conseguir atingir os menores valores de limite de detecção. Foram avaliadas dessorções no modo estático por 10, 15 e 20 minutos. Analisando o gráfico da Figura 49, pode-se observar que para a maioria dos compostos estudados a resposta analítica aumenta com o aumento do tempo de dessorção até os 15 min, com exceção do tiabendazol que teve melhores resultados com 20 min de dessorção. Para a permetrina, abamectina, carbosulfan e bifentrina não ocorreram variações significativas nos resultados, em função da variação do tempo de dessorção. Na avaliação do tempo de dessorção, pode-se concluir que 15 min é o melhor tempo, por fornecer melhores resultados para o maior número de compostos.

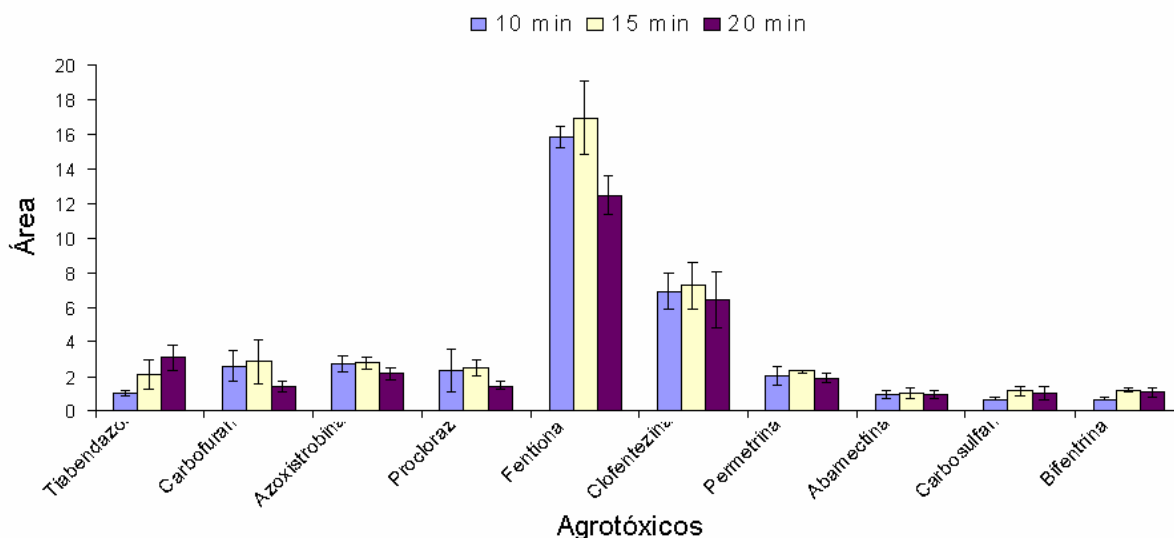


Figura 49. Avaliação do tempo de dessorção (modo estático) na interface SPME-HPLC. Extrações com imersão direta da fibra de PA a 50°C por 30 min, com agitação de 250 rpm e com a matriz fortificada (50 µg kg⁻¹).

5.5.4. Validação do método

A validação do método com o uso das condições de dessorção na interface SPME/HPLC e análise por HPLC-UV-Vis, foi realizada com o estudo das faixas de trabalho, linearidade, sensibilidade, limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), precisão (RSD) e a exatidão pelo estudo da recuperação relativa em diferentes níveis de fortificação e da recuperação absoluta.

5.5.4.1. Curvas analíticas (linearidade) e faixas de trabalho

Para a quantificação dos agrotóxicos foi utilizado o método da padronização externa, com curvas analíticas construídas com sete pontos correspondendo aos níveis de fortificação de 2,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 250,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, onde cada ponto foi obtido em triplicata sendo que os resultados dos desvios-padrão mostraram que a dispersão nos resultados nas análises foi independente da concentração da amostra. Após a identificação do efeito matriz, foram preparados extratos sem a presença dos agrotóxicos seguindo o procedimento descrito no item 4.10. Os extratos obtidos foram fortificados nos níveis de concentração estabelecidos para a construção das curvas analíticas. As curvas foram construídas com extrações dos agrotóxicos por DI-SPME e dessorção na interface SPME/HPLC nas condições otimizadas. As curvas analíticas obtidas foram utilizadas para o estudo da sensibilidade, exatidão e precisão do método proposto. As equações obtidas apresentaram boa linearidade, com coeficientes de correlação variando entre 0,9903 (Carbosulfan) e 0,9997 (Tiabendazol). O método desenvolvido apresenta faixa linear de trabalho entre 2,0 e 250,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 5,0 e 250,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com exceção da permetrina que só apresentou linearidade até 100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A Tabela 16 mostra os tempos de retenção dos compostos, as equações das retas obtidas por regressão linear, a faixa linear de trabalho de cada composto e os coeficientes de determinação (R^2).

Tabela 16. Equações obtidas por regressão linear, coeficientes de determinação (R^2) e faixas lineares de trabalho na análise por DI-SPME-HPLC-UV-VIS.

Agrotóxicos	$T_{Retenção}$ (min)	Equação por regressão linear	Faixa linear de trabalho ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	R^2
Tiabendazol	6,07	$0,087x + 0,014$	5,0 – 250,0	0,9997
Carbofuran	11,04	$0,027x + 0,116$	10,0 – 250,0	0,9969
Azoxistrobina	17,05	$0,148x + 0,552$	2,0 – 250,0	0,9994
Procloraz	19,73	$0,042x + 0,172$	5,0 – 250,0	0,9960
Fentiona	21,75	$0,057x + 0,180$	2,0 – 250,0	0,9961
Clofentezina	22,68	$0,024x + 0,154$	5,0 – 250,0	0,9988
Permetrina	24,75	$0,029x + 0,263$	5,0 – 250,0	0,9920
Abamectina	28,19	$0,073x + 0,394$	5,0 – 250,0	0,9992
Carbosulfan	36,79	$0,070x + 0,090$	5,0- 250,0	0,9903
Bifentrina	38,17	$0,051x + 0,116$	2,0 – 250,0	0,9917

5.5.4.2. Sensibilidade

A sensibilidade foi avaliada pela variação da resposta analítica no intervalo de concentração de 10,0 a 250,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A sensibilidade foi calculada pela relação $S = dx/dc$, onde S é a sensibilidade, dx é a variação da resposta analítica e dc é a variação da concentração. A Tabela 17 mostra os valores obtidos para S no intervalo de concentração estabelecido.

Tabela 17. Estudo da sensibilidade do método no intervalo de 10,0 a 250,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Agrotóxicos	S	Agrotóxicos	S
Tiabendazol	0,087	Clofentezina	0,024
Carbofuran	0,027	Permetrina	0,029
Azoxistrobina	0,146	Abamectina	0,072
Procloraz	0,042	Carbosulfan	0,068
Fentiona	0,056	Bifentrina	0,049

5.5.4.3. Limites de detecção (LOD) e Limites de quantificação (LOQ)

Para obter os limites de detecção e de quantificação do método proposto por DI-SPME-HPLC-UV-Vis, foram realizadas extrações sucessivas diminuindo a concentração dos agrotóxicos até perder a proporcionalidade entre a concentração e a resposta analítica do detector. Os limites de detecção e de quantificação foram estabelecidos em conjunto com o estudo da faixa linear de trabalho na construção da curva analítica, estando os agrotóxicos em presença do extrato da matriz. Os LOD foram estabelecidos utilizando o mesmo critério da metodologia por GC-MS (Método da relação sinal-ruído). O menor nível de concentração na curva analítica corresponde ao início da faixa linear de trabalho e ao LOQ para cada composto. Os LOD e LOQ obtidos variaram entre 0,6 e 3,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e entre 2,0 e 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Os limites de quantificação obtidos pelo método proposto são menores que os valores dos limites máximos de resíduos estabelecidos pela ANVISA para os compostos tiabendazol, azoxistrobina, procloraz, fentiona, abamectina, carbosulfan, e bifentrina que são autorizados para aplicações no cultivo da manga. Os limites de detecção e de quantificação obtidos pelo método proposto são mostrados na Tabela 18.

Tabela 18. Limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ) obtidos para os agrotóxicos estudados por SPME-HPLC-UV-Vis.

Agrotóxicos	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Tiabendazol	1,6	5,0	2000,0
Carbofuran	3,3	10,0	-
Azoxistrobina	0,6	2,0	500,0
Procloraz	1,6	5,0	200,0
Fentiona	0,6	2,0	50,0
Clofentezina	1,6	5,0	-
Permetrina	0,6	2,0	-
Abamectina	1,6	5,0	10,0
Carbosulfan	1,6	5,0	50,0
Bifentrina	0,6	2,0	100,0

Uma particularidade deste estudo está relacionada a abamectina, onde são relatados na literatura estudos para a sua determinação em frutas, tais como laranja por LC-ESI-MS/MS [Pozo *et al.*, 2003] e abacate por HPLC-FLD [Hernández-Borges *et al.*, 2007]. No estudo realizado por Pozo *et al.* (2003) a extração foi realizada com acetonitrila auxiliada por sonicação obtendo limite de quantificação de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, ou seja, superior ao valor obtido pelo método desenvolvido por DI-SPME-HPLC-UV-Vis. No estudo realizado por Hernández-Borges *et al.* (2007), o procedimento de extração da abamectina foi realizado por SPE e foi obtido limite de quantificação de $7 \mu\text{g kg}^{-1}$. Entretanto, para conseguir este resultado foi necessário fazer a derivatização da abamectina com ácido trifluoroacético (TFA) e trietilamina (TEA). Um dos méritos deste trabalho foi conseguir um limite de quantificação inferior aos relatados para abamectina, utilizando um sistema de detecção mais simples, sem a necessidade de realizar procedimentos para a derivatização, como também empregando uma técnica que permite a realização simultânea da extração e concentração do analito com uso mínimo de solvente orgânico. A Figura 50 mostra um cromatograma obtido por DI-SPME-HPLC-UV-Vis, correspondente à fortificação da matriz na concentração de $5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, que foi a menor concentração da curva analítica da abamectina e que corresponde ao seu limite de quantificação.

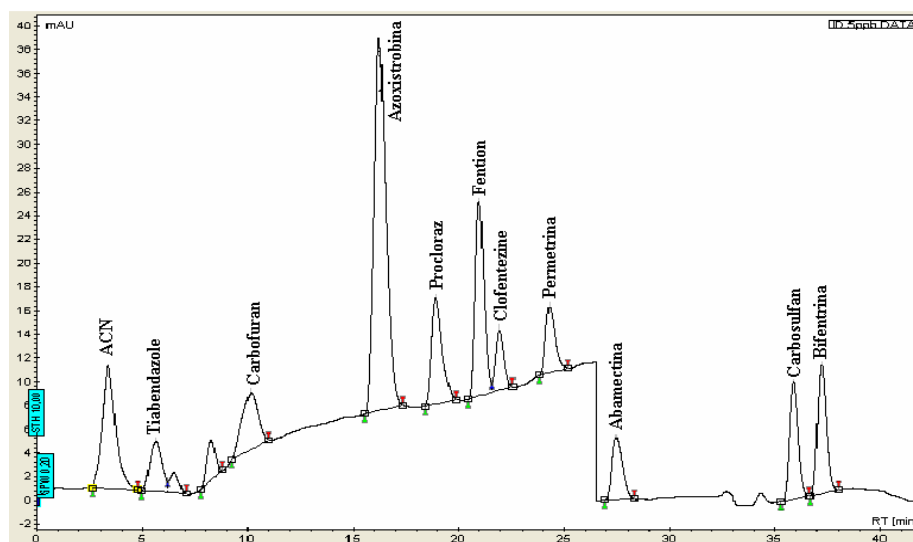


Figura 50. Cromatograma obtido por DI-SPME-HPLC-UV-Vis com a fortificação da matriz na concentração de $5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$. Coluna de fase reversa XTerra® MS C₁₈ 5 μm (250 mm x 2.1 mm), fase móvel água (A) e acetonitrila (B), 30% de B (início), 70% de B (6 min), 80% de B (18 min), 100% de B (22 - 32 min), 30% de B (35 - 42 min), fluxo de $0,25 \text{ mL min}^{-1}$. O detector UV-Vis operou em 203 nm (0 - 26,5 e 31- 42 min) e em 245 nm (26,5 - 31 min).

5.5.4.4. Precisão do método

A precisão do método foi avaliada efetuando-se o estudo da precisão intradia e da precisão interdias (precisão intermediária) em dois diferentes níveis de fortificação (10,0 e 100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$). A precisão intradia consistiu na realização de sete extrações no mesmo dia e a precisão interdias foi estudada durante cinco dias consecutivos, efetuando-se três extrações em cada dia. Os valores dos CV (%) obtidos no estudo da precisão com níveis de fortificação de 10,0 e 100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ são mostrados na Tabela 19.

Tabela 19. Estudo da precisão por SPME-HPLC-UV-Vis em dois níveis de fortificação.

Agrotóxicos	Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CV (%)	
		Intradia (n = 7)	Interdias (n = 15)
Tiabendazol	10,0	12,0	17,2
	100,0	5,6	5,4
Carbofuran	10,0	17,8	9,7
	100,0	10,6	9,1
Azoxistrobina	10,0	11,0	5,3
	100,0	7,6	4,5
Procloraz	10,0	16,1	10,6
	100,0	7,5	4,3
Fentiona	10,0	12,8	8,2
	100,0	10,1	8,8
Clofentezina	10,0	6,9	16,3
	100,0	8,7	18,1
Permetrina	10,0	7,5	10,1
	100,0	10,4	12,8
Abamectina	10,0	11,5	8,3
	100,0	6,0	4,6
Carbosulfan	10,0	8,6	9,7
	100,0	11,6	11,5
Bifentrina	10,0	18,6	16,2
	100,0	9,7	10,1

No estudo da precisão intradia foram obtidos valores entre 6,9 % (clofentezina) e 18,6 % (bifentrina) no menor nível de fortificação e entre 5,6 % (tiabendazol) e 11,6 % (carbosulfan) no maior nível. No estudo da precisão interdias foram obtidos valores entre

5,3 % (azoxistrobina) e 17,2 % (tiabendazol) no menor nível de fortificação e entre 4,3 % (procloraz) e 18,1 % (clofentezina) no maior nível. Estes valores estão em acordo com os critérios de validação descritos por Ribani *et al.*, (2004), que estabelecem CV de até 20% para análises de compostos presentes em matrizes complexas em baixos níveis de concentração.

5.5.4.5. Exatidão do método

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada realizando-se o estudo das recuperações relativa e absoluta. As recuperações relativas foram avaliadas em três níveis de fortificação (10,0; 100,0 e 250,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$), sendo que o menor nível de fortificação (10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) corresponde ao limite de quantificação do carbofuran. No menor nível as recuperações apresentaram variação entre 75,1 % \pm 17,8 % (carbofuran) e 104,1 % \pm 18,6 % (bifentrina). No nível intermediário (100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) as recuperações apresentaram variação entre 79,4 % \pm 10,6 % (carbofuran) e 86,7 % \pm 10,4 % (permetrina) e no maior nível (250,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) as recuperações variaram entre 73,3 % \pm 11,0 % (tiabendazol) e 86,1 % \pm 7,5 % (carbosulfan).

A recuperação absoluta foi calculada por comparação entre as áreas dos picos obtidas ($n = 3$) pela injeção direta de 3 μL de uma mistura-padrão de concentração 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e as áreas obtidas ($n = 3$) nas extrações dos agrotóxicos por DI-SPME em amostras de manga fortificadas com 3 μL da mesma mistura-padrão (3 μL da mistura padrão em 3 g de manga, proporciona uma fortificação de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$), efetuando-se uma comparação entre as respostas do detector para o mesmo nível de concentração. A injeção direta da mistura padrão foi realizada por adição de 3 μL da solução padrão (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) na câmara de dessorção, completando-se em seguida o seu volume interno (60 μL) com acetonitrila para obter uma situação igual a que ocorre no momento da dessorção, quando a fibra fica imersa na câmara preenchida com acetonitrila por 15 min para realizar a dessorção no modo estático. Como já foi discutido no item 5.5.3.2. A microextração em fase sólida, por ser uma técnica de extração não exaustiva, proporciona recuperações diretas usualmente menores que 30% [Picó *et al.*, 2007]. Os resultados obtidos estão de acordo com os valores descritos na literatura. A Tabela 20 mostra os resultados das recuperações relativas obtidas

em três diferentes níveis de fortificação e as recuperações absolutas no menor nível de fortificação, com os seus respectivos desvios padrões relativos (RSD %).

Tabela 20. Recuperações relativas e RSD (%) em três níveis de fortificação e a recuperação absoluta e RSD (%).

Agrotóxicos	Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)			
		Relativa	RSD (%)	Absoluta	RSD (%)
Tiabendazole	10	89,8	12,0	26,9	3,3
	100	85,0	5,6		
	250	73,3	11,0		
Carbofuran	10	75,1	17,8	4,61	0,7
	100	79,4	10,6		
	250	81,5	11,1		
Azoxistrobina	10	82,8	11,0	12,2	1,5
	100	84,2	7,6		
	250	78,4	5,2		
Procloraz	10	91,2	16,1	12,9	1,1
	100	82,1	7,5		
	250	75,9	5,6		
Fentiona	10	85,7	12,8	12,0	0,8
	100	82,4	10,1		
	250	76,6	8,1		
Clofentezina	10	92,3	6,9	16,4	2,0
	100	84,5	8,7		
	250	78,9	6,8		
Permetrina	10	81,1	7,5	18,7	1,5
	100	86,7	10,4		
	250	82,2	11,9		
Abamectina	10	77,4	11,5	41,8	3,2
	100	80,5	6,0		
	250	76,0	11,7		
Carbosulfan	10	78,0	8,6	23,1	2,8
	100	83,9	11,6		
	250	86,1	7,5		
Bifentrina	10	104,4	18,6	14,8	1,5
	100	80,7	9,7		
	250	78,7	13,9		

5.5.5. Aplicação da metodologia desenvolvida por DI-SPME-HPLC-UV-Vis na análise de resíduos de agrotóxicos em amostras comerciais.

O método proposto foi aplicado na análise de amostras reais para determinar resíduos dos agrotóxicos tiabendazol, carbofuran, azoxistrobina, procloraz, fentiona, clofentezina, permetrina, abamectina, carbosulfan e bifentrina em oito amostras de manga cultivadas com os métodos agrícolas convencionais. As amostras foram coletadas em oito pontos comerciais na cidade de Aracaju-SE, no mês de julho de 2009. No momento da coleta foi observado o fornecedor do produto, para identificar a origem da região produtora, sendo observado que as mangas comercializadas na cidade de Aracaju são produzidas na região do Vale do São Francisco, que contempla os projetos irrigados de Juazeiro-BA, e Petrolina-PE e no Platô de Neópolis-SE. Após a coleta, cada amostra foi dividida em dois lotes e imediatamente processada seguindo o procedimento descrito no item 4.9, sendo um lote processado com casca e polpa e o outro processado somente com a polpa. As amostras foram analisadas em triplicata e entre as análises de cada amostra foi sempre realizado um branco da fibra para evitar o efeito de memória e garantir a exatidão das medidas. A Tabela 21 mostra os resultados obtidos com os respectivos desvios-padrão de cada análise. Os agrotóxicos tiabendazol, carbofuran, procloraz, clofentezina e carbosulfan não foram detectados nas amostras. Azoxistrobina foi detectado na amostra A com concentração de $3,5 \pm 0,4 \mu\text{g kg}^{-1}$. Entretanto, não foi detectada na análise da polpa. Fentiona e abamectina foram detectadas nas análises dos frutos inteiros das amostras A e H com concentrações de $2,6 \pm 0,3$ e $5,7 \pm 0,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a fentiona e $4,3 \pm 0,4$ e $5,3 \pm 0,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a abamectina, respectivamente. Estes compostos também não foram detectados nas análises das polpas. Resíduos de bifentrina foram detectados na análise do fruto inteiro em cinco amostras (A, E, F, G e H) com concentrações variando entre $3,0 \pm 0,5$ e $10,6 \pm 1,9 \mu\text{g kg}^{-1}$, sendo detectada nas análises das polpas das amostras F, G e H, com concentrações entre $3,0 \pm 0,5$ e $4,2 \pm 0,7 \mu\text{g kg}^{-1}$. Resíduos de permetrina foram detectados nas análises do fruto inteiro em seis amostras (A, B, C, D, E, e H) com concentração variando entre $6,9 \pm 0,7$ e $16,3 \pm 1,1 \mu\text{g kg}^{-1}$, sendo detectada nas análises das polpas das amostras A, D e H, com concentração entre $3,7 \pm 0,3$ e $15,3 \pm 0,9 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os piretróides permetrina e bifentrina foram os únicos compostos detectados nas polpas. Estes compostos são inseticidas e

acaricidas de contato e ingestão com amplo espectro de ação, que se caracterizam por formar uma película protetora no fruto impedindo o ataque de insetos. Entretanto, apresentam caráter lipofílico e por ação translaminar podem penetrar no fruto em dosagens menores em relação a sua aplicação. Consequentemente, as concentrações destes compostos na polpa do fruto serão menores, pois apresentam maior ação na parte externa do fruto. As concentrações encontradas estão abaixo dos LMR estabelecidos pela ANVISA. Entretanto, o uso da permetrina não é autorizado para o cultivo da manga e este foi o agrotóxico presente no maior número de amostras e com as maiores concentrações.

Tabela 21. Resultados obtidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) e desvios-padrão (n = 3) das análises por DI-SPME-HPLC-UV-Vis das amostras comerciais.

Amostras Pesticidas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	A		B		C		D		E		F		G		H	
	FI	P	FI	P	FI	P	FI	P	FI	P	FI	P	FI	P	FI	P
Tiabendazol	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Carbofuran	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Azoxistrobina	3,5	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	$\pm 0,4$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Procloraz	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Fentiona	2,6	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	5,7	n.d
	$\pm 0,3$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$\pm 0,6$	-
Clofentezina	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Permetrina	16,3	15,3	12,8	<LQ	10,7	<LQ	16,3	8,9	7,8	<L.Q	n.d	n.d	n.d	n.d	6,9	3,7
	$\pm 1,1$	$\pm 0,9$	$\pm 1,3$	-	$\pm 0,9$	-	$\pm 1,3$	$\pm 0,7$	$\pm 0,7$	-	-	-	-	-	$\pm 0,7$	$\pm 0,3$
Abamectina	4,3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	5,3	n.d
	$\pm 0,4$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$\pm 0,6$	-
Carbosulfan	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Bifentrina	4,2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	3,0	n.d	8,9	4,2	8,2	3,0	10,6	3,4
	$\pm 0,7$	-	-	-	-	-	-	-	$\pm 0,5$	-	$\pm 1,1$	$\pm 0,7$	$\pm 0,9$	$\pm 0,5$	$\pm 1,9$	$\pm 0,6$

Obs: FI = fruta inteira; P = polpa da manga; n.d = não detectado.

5.6. Comparação dos resultados obtidos por DI-SPME-GC-MS e DI-SPME-HPLC-UV-Vis.

Na Tabela 22 é feita uma comparação das figuras de mérito (limite de quantificação, precisão e exatidão) obtidas na validação dos métodos analíticos desenvolvidos por DI-SPME-GC-MS e DI-SPME-HPLC-UV-Vis. Dos dezesseis compostos selecionados para o estudo, quatorze foram determinados por GC e dez por HPLC, sendo oito compostos em comum (clofentezina, carbofuran, fentiona, procloraz, bifentrina, permetrina, tiabendazol e azoxistrobina). Esta diferença no número de compostos se deveu, à maior dificuldade encontrada para a separação dos mesmos por HPLC, sem comprometer o tempo de análise. Os limites de quantificação obtidos por GC-MS variaram entre 3,3 e 33,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e por HPLC-UV-Vis variaram entre 2,0 e 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo que dos oito compostos em comum, sete apresentaram menores LOQ no método desenvolvido por HPLC-UV-Vis. Na avaliação da precisão intradia e intermediária, os valores obtidos nos dois métodos foram satisfatórios e equivalentes. A exatidão foi avaliada com o estudo da recuperação relativa e absoluta. A Tabela 22 mostra os valores obtidos para os menores níveis de fortificação de cada método. Para as recuperações relativas os valores obtidos também foram equivalentes e satisfatórios variando entre 71,6 % e 117,5 % por GC-MS e entre 75,1 % e 104,4 % por HPLC-UV-Vis. Com relação à recuperação absoluta, os valores obtidos para o carbofuran e azoxistrobina foram equivalentes, porém há uma considerável variação nos valores obtidos para a clofentezina, fentiona, tiabendazol, bifentrina, permetrina e procloraz, onde foram obtidos valores de 3 a 11 vezes maiores no método desenvolvido por HPLC-UV-Vis. Como esta recuperação foi calculada por comparação dos resultados obtidos pela injeção direta dos padrões e pela extração, o sistema de detecção não influi. Entretanto, houve modificações na extração com relação ao tipo de fibra que foi utilizada e em relação ao modo de agitação, sendo que estes fatores devem ter contribuído para aumentar a eficiência na extração, proporcionando melhores recuperações absolutas. A Tabela 23 mostra a comparação entre os resultados das recuperações relativa e absoluta obtidas respectivamente por SPME-GC-MS e SPME-HPLC-UV-Vis, usando-se o teste $t_{95\%}$ de Student, com um nível de confiança de 95 %. Quando o $t_{calculado}$ é menor que o $t_{tabelado}$, não existe diferença significativa entre os resultados no nível de confiança estudado. A Tabela 23 mostra que os resultados obtidos para as

recuperações relativas nos dois métodos foram equivalentes, tendo em vista que o valor de $t_{calculado}$ foi menor que o $t_{tabelado}$, para todos os compostos analisados pelos dois métodos. Com relação a recuperação absoluta, o valor de $t_{calculado}$ só foi menor que o $t_{tabelado}$ para o carbofuran e a azoxistrobina, mostrando que para os demais compostos (clofentezina, fentiona, tiabendazol, procloraz, permetrina e bifentrina) existe uma diferença significativa a favor das análises por SPME-HPLC-UV-Vis.

Tabela 22. Comparação dos limites de quantificação, precisão e exatidão dos métodos desenvolvidos.

Agrotóxicos	DI-SPME-GC-MS					DI-SPME-HPLC-UV-Vis				
	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Precisão CV (%) ($50,0 \mu\text{g kg}^{-1}$)		Exatidão (%) ($33,3 \mu\text{g kg}^{-1}$)		LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Precisão CV (%) ($10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$)		Exatidão (%) ($10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$)	
		Intradia	Interdias	Relativa	Absoluta		Intradia	Interdias	Relativa	Absoluta
Clofentezina	3,3	7,4	9,1	89,6	4,0	5,0	6,9	16,3	92,3	16,4
Carbofuran	33,3	5,8	12,1	89,3	5,2	10,0	17,8	9,7	75,1	4,6
Diazinona	16,6	4,0	13,6	117,5	0,8	-	-	-	-	-
Parationa	16,6	6,7	11,5	91,8	2,4	-	-	-	-	-
Malationa	6,6	10,8	12,9	83,8	3,5	-	-	-	-	-
Fentiona	3,3	8,3	7,0	75,8	3,8	2,0	12,8	8,2	85,7	12,0
Tiabendazole	33,3	17,0	19,9	90,0	9,7	5,0	12,0	17,2	89,8	26,9
Imazalil	33,3	12,5	22,0	102,2	1,1	-	-	-	-	-
Bifentrina	6,6	5,8	13,2	71,6	1,6	2,0	18,6	16,2	104,4	14,8
Permetrina	16,6	10,0	13,6	80,8	1,6	2,0	7,5	10,1	81,1	18,7
Procloraz	6,6	8,4	10,2	108,7	1,5	5,0	16,1	10,6	91,2	12,9
Piraclostrobina	16,6	7,5	12,7	115,9	12,3	-	-	-	-	-
Difenoconazole	3,3	7,5	9,2	110,9	17,8	-	-	-	-	-
Azoxistrobina	6,6	6,6	12,0	84,7	16,0	2,0	11,0	5,3	82,8	12,2
Carbosulfan	-	-	-	-	-	5,0	8,6	9,7	78,0	23,1
Abamectina	-	-	-	-	-	5,0	18,6	8,3	77,4	41,8

Tabela 23. Comparação das recuperações relativa e absoluta obtidas por SPME-GC-MS e SPME-HPLC-UV-Vis, usando-se o teste $t_{95\%}$ de Student com um nível de confiança de 95%.

Agrotóxicos	Exatidão relativa ($t_{\text{tabelado}} = 3,182$)	Exatidão absoluta ($t_{\text{tabelado}} = 3,182$)
	$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{calculado}}$
Clofentezina	2,314	3,982 ($t_{\text{calc.}} > t_{\text{tab.}}$)
Carbofuran	1,715	1,231
Fentiona	2,109	4,023 ($t_{\text{calc.}} > t_{\text{tab.}}$)
Tiabendazole	1,699	3,783 ($t_{\text{calc.}} > t_{\text{tab.}}$)
Bifentrina	1,634	4,104 ($t_{\text{calc.}} > t_{\text{tab.}}$)
Permetrina	2,074	4,753 ($t_{\text{calc.}} > t_{\text{tab.}}$)
Procloraz	1,853	5,302 ($t_{\text{calc.}} > t_{\text{tab.}}$)
Azoxistrobina	0,034	2,215

5.7. Identificação da presença de interferentes provenientes da matriz.

Durante a etapa de otimização das condições de extração dos agrotóxicos na manga por SPME e análise por GC-MS (modo SCAN), foi observado no cromatograma a presença de um interferente proveniente da matriz que apresentou grande intensidade na resposta analítica. Como a escala da intensidade dos picos é normalizada pelo pico de maior intensidade, os picos da maioria dos pesticidas foram mascarados, como pode ser observado na Figura 51. O espectro de massas deste interferente é mostrado na Figura 52.

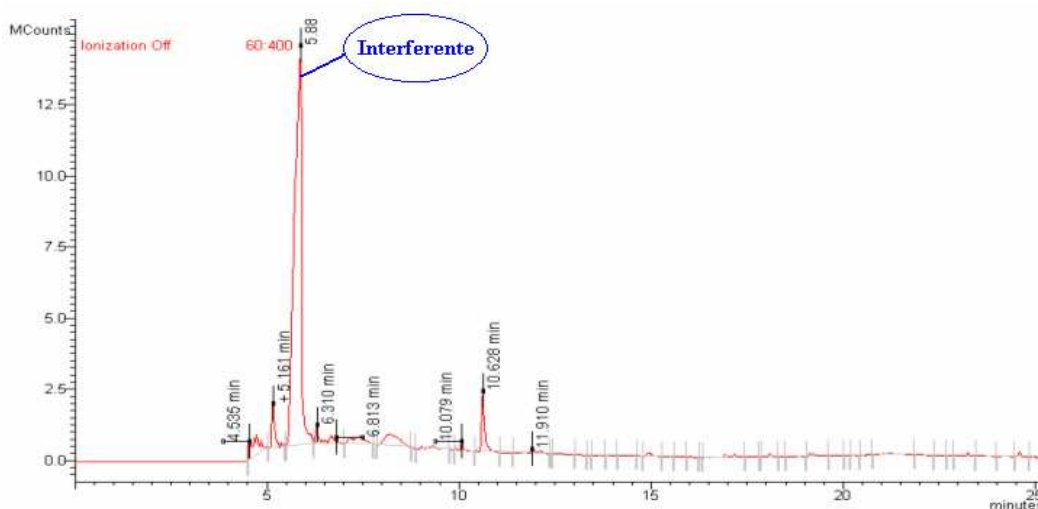


Figura 51. Cromatograma (modo SCAN) de extrato de amostra de manga obtido por SPME-GC-MS, indicando a presença do interferente.

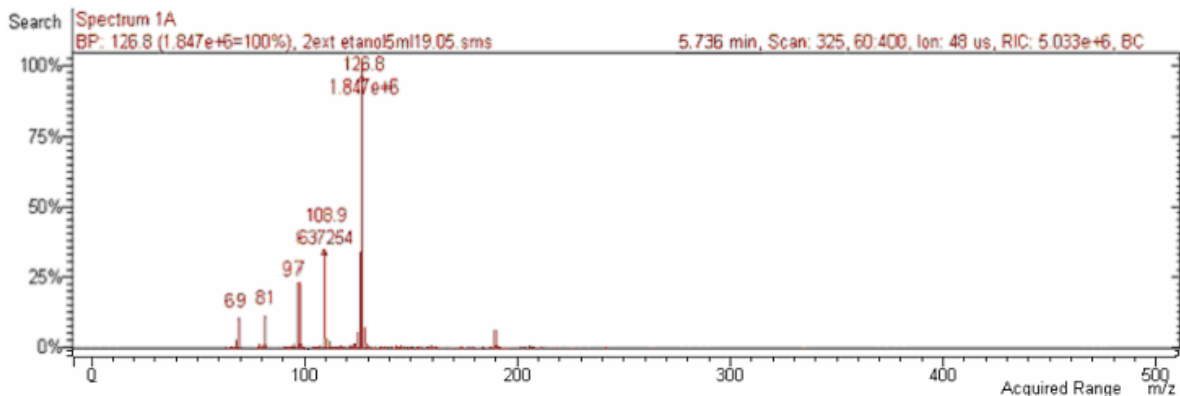


Figura 52. Espectro de massas do interferente extraído da matriz e obtido por impacto de elétrons (70 eV).

O fato de este interferente apresentar grande intensidade na resposta analítica mostra que a sua extração por DI-SPME é eficiente e despertou curiosidade em relação à sua identificação e origem. Com esses objetivos foi realizado um estudo mais detalhado.

Inicialmente foi feita a tentativa de identificação do interferente por comparação do seu espectro de massas com espectros-padrão da biblioteca eletrônica NIST 2.0. O espectro que apresentava maior similaridade correspondia a um éster de cadeia cíclica, com fórmula molecular $C_{32}H_{54}O_4$ e massa molecular de 502 u (Figura 53). Entretanto, deve-se ressaltar ser improvável um composto de massa molecular 502 u eluir com um tempo de retenção de 5,73 min nas condições cromatográficas utilizadas.

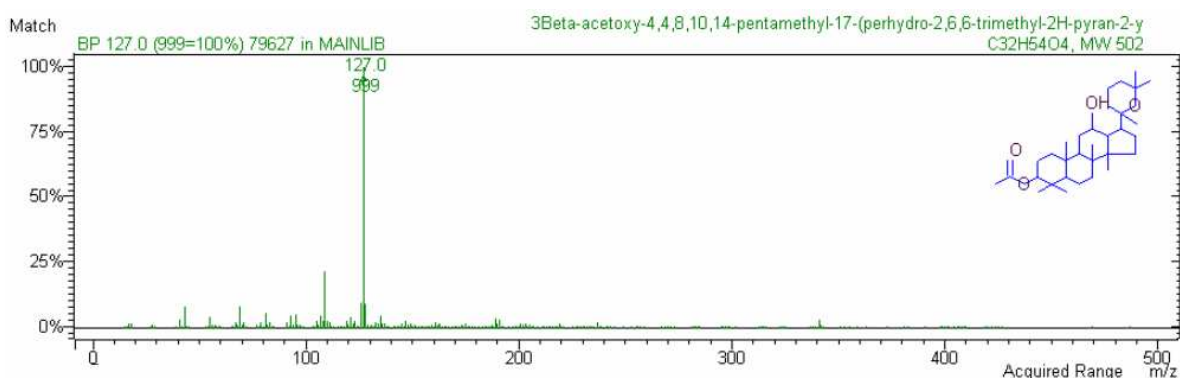


Figura 53. Espectro de massas do composto com maior similaridade com o espectro do interferente extraído da matriz e obtido por impacto de elétrons (70 eV).

Com a aquisição do GC-MS/MS triploquadropolo pelo LPQ, foi possível realizar um estudo para identificar o composto interferente e assim justificar a sua origem e a razão

pela qual a sua resposta analítica é elevada. Neste sentido, foram realizadas extrações por DI-SPME em extratos da matriz preparados em água e sem a presença dos agrotóxicos. As análises no GC-MS/MS foram realizadas com ionização química, utilizando como gás reagente o metano (CH_4), que promove a ionização no modo positivo (PCI) e permite a identificação do íon $[\text{M}+\text{H}]^+$. O espectro de massas obtido com a ionização química mostra que o íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ corresponde a 127 m/z (Figura 54), revelando que o composto interferente apresenta massa molecular de 126 u, confirmando portanto não fazer sentido o resultado obtido por comparação do espectro com a biblioteca eletrônica, que dava uma maior similaridade com um éster de massa molecular 502 u.

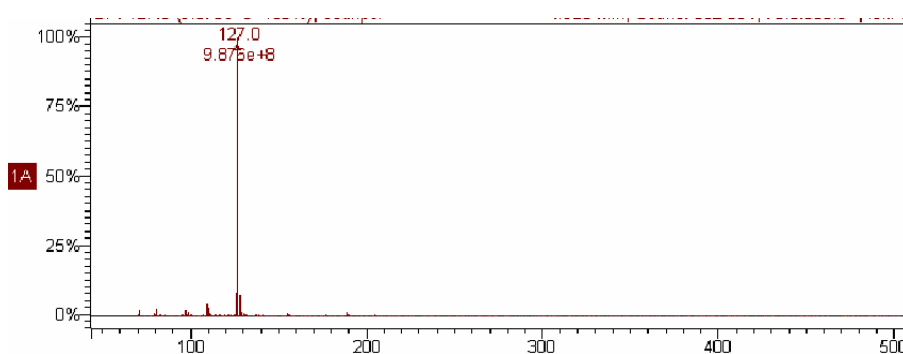


Figura 54. Espectro de massas obtido por ionização química com a formação do íon $m/z = 127$, correspondendo ao íon $[\text{M}+\text{H}]^+$.

A seguir, foi realizado um experimento de MS/MS isolando o íon de $m/z = 127$ no 1° quadrupolo (Q1), o qual em seguida sofreu colisão induzida com argônio no 2° quadrupolo (Q2), com energia de colisão de 10 Volts, gerando em consequência os íons 109 (provável perda de água) e 81 (provável perda de carbonila a partir do íon 109) que foram identificados no 3° quadrupolo (Q3), quando este operou no modo Scan com varredura de 70 a 150 m/z (Figura 55). Para confirmar que o íon 81 m/z era originado a partir do íon 109 m/z, foram realizados novos experimentos variando a energia de colisão para 15 e 20 eV, sendo observado que aumentando-se a energia de colisão ocorreu um aumento na intensidade do íon 81 e um decréscimo na intensidade do íon 109, como pode ser observado na Figura 56 que mostra o espectro de massas obtido com energia de colisão de 15 eV. Com base no espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) e com base na interpretação dos espectros de massas obtidos por impacto de elétrons e por ionização química, no espectro obtido por MS/MS foi possível identificar o interferente extraído da manga como sendo o 5-hidroxi-metilfurfural (5-HMF).

Para a confirmação final foi injetado um padrão de 5-HMF nas mesmas condições cromatográficas, sendo observado o mesmo tempo de retenção. O espectro de massas obtido por impacto de elétrons para o padrão confirmou a formação dos mesmos íons presentes no espectro do interferente (Figura 57). A Figura 58 mostra a estrutura química do 5-HMF.

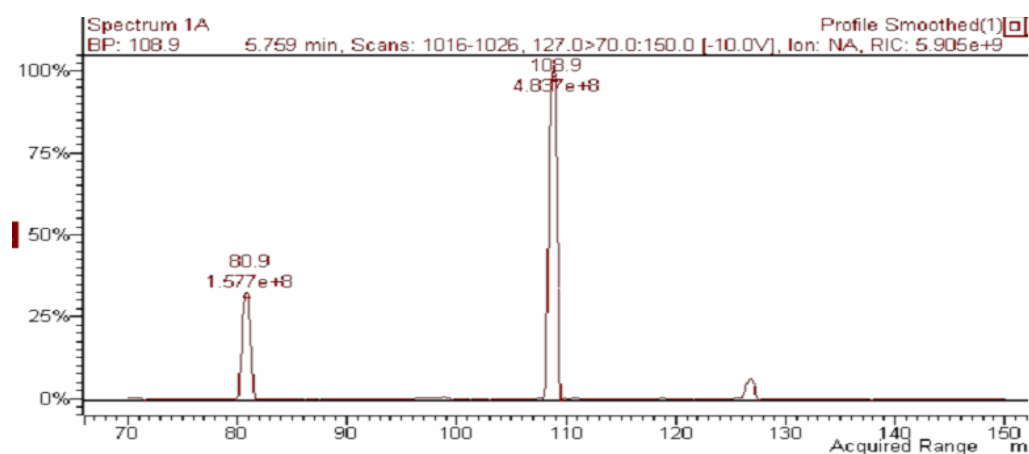


Figura 55. Espectro de massas (MS/MS) obtido na fragmentação do íon 127 m/z com energia de colisão de 10 eV.

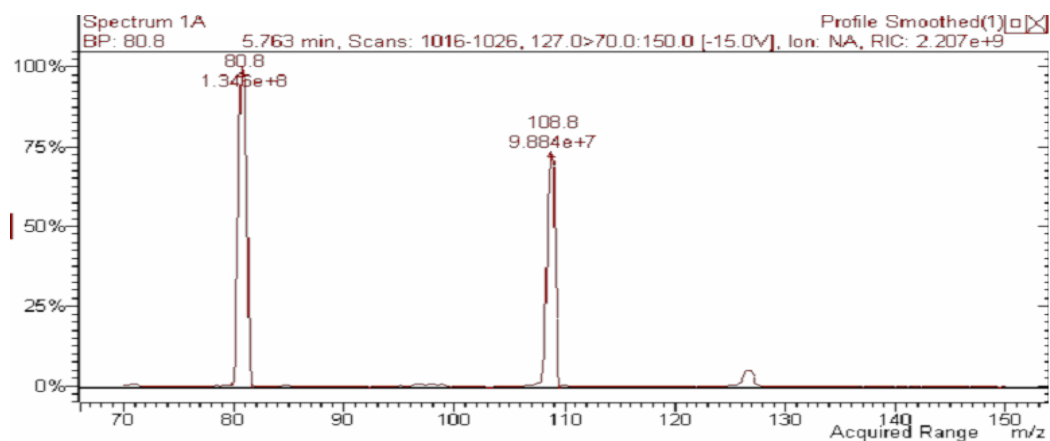


Figura 56. Espectro de massas (MS/MS) obtido na fragmentação do íon 127 m/z com energia de colisão de 15 eV.

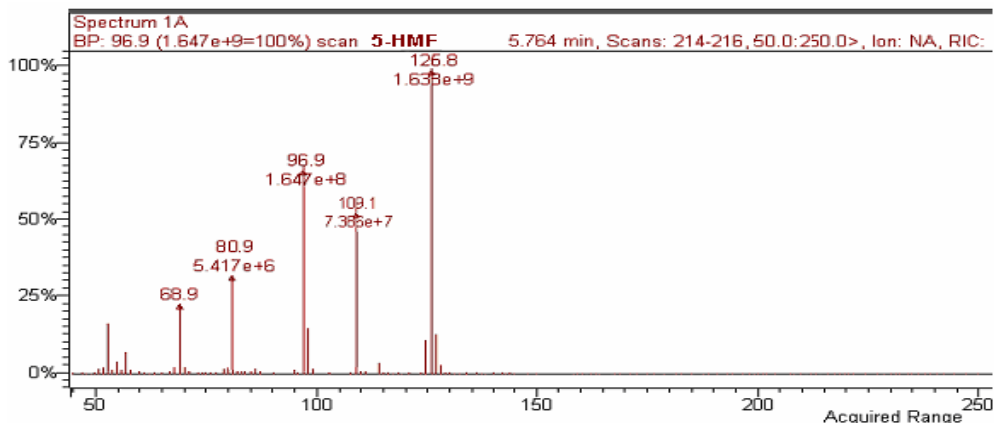


Figura 57. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons para o padrão de 5-HMF.

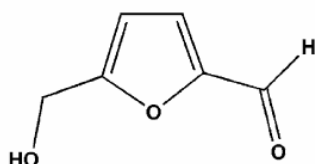


Figura 58. Estrutura química do 5-hidroxi-metilfurfural (5-HMF).

A presença do 5-HMF em alimentos industrializados e frutas têm sido relatada na literatura como, por exemplo, em cereais para o café da manhã [García-Villanova *et al.*, 1993], em geléias e frutas [Rada-Mendoza *et al.*, 2002], em leite longa vida [Ferrer *et al.*, 2002], em biscoitos [Ameur, Trytram & Birlouez-Aragon, 2006] e mais recentemente a determinação de 2-furfural, 5-HMF e 5-MF em alimentos por DI-SPME e GC-FID e/ou GC-TOF-MS [Gaspar & Lopes, 2009].

A presença do 5-HMF em alimentos industrializados pode advir do seu processamento, quando este envolve o aquecimento com elevadas temperaturas, ou formação durante a estocagem, sendo que nesta segunda situação a formação ocorre de forma mais lenta. É comum a presença de furfural e seus derivados em frutas *in natura*, sendo estes formados a partir da desidratação de carboidratos presentes nas mesmas. Entretanto, as suas concentrações aumentam quando o transporte e estocagem são realizados em situações onde a fruta fica exposta ao sol [Rada-Mendoza *et al.*, 2004]. Alimentos ricos em carboidratos que são processados com aquecimento podem levar à redução dos carboidratos, resultando na reação de Maillard. Esta reação ocorre entre o

açúcar reduzido e aminoácidos, peptídeos ou proteínas, causando modificações na cor, flavor e propriedades funcionais dos alimentos [García-Villanova *et al.*, 1993].

O mecanismo químico de formação do 5-HMF a partir da pirólise de carboidratos, mais especificamente da d-glucose e d-frutose foram descritos por Paine III, Pithawalla & Naworal (2008). O esquema de reações representado na Figura 59 mostra o mecanismo de conversão da frutose em formaldeído, furfural e 5-hidroximetilfurfural.

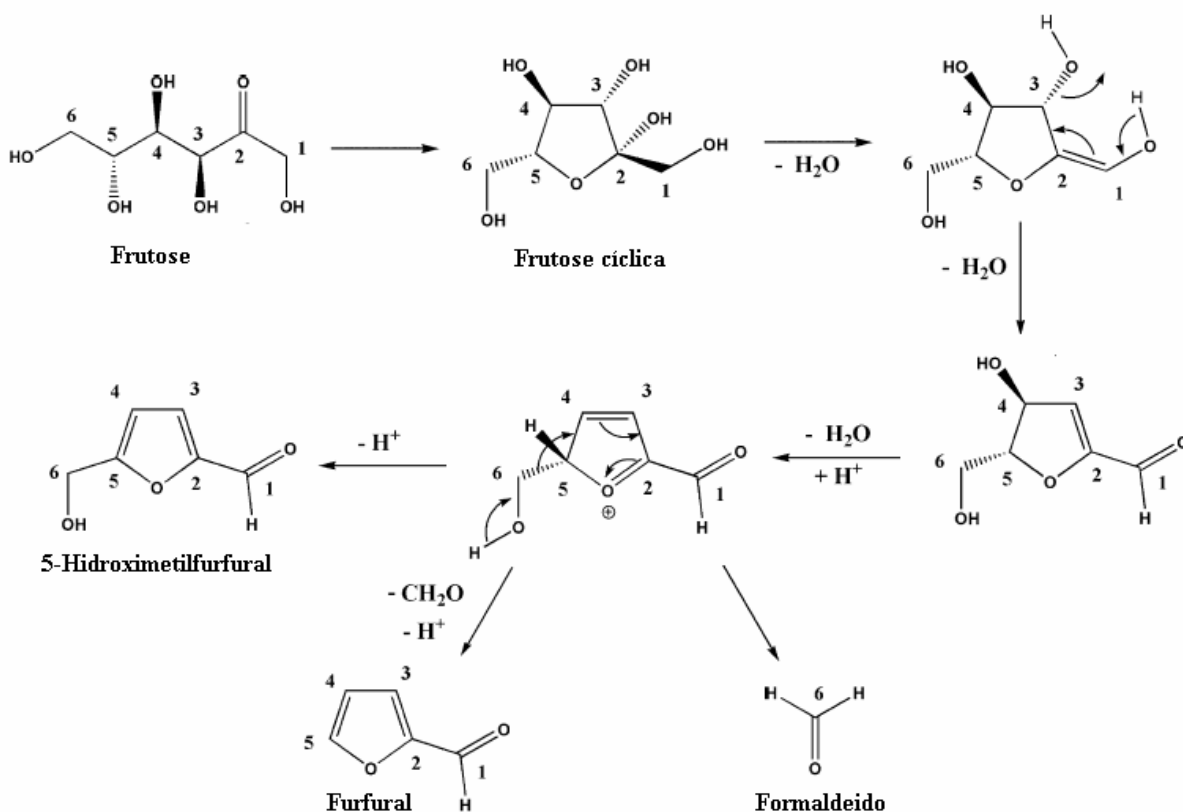


Figura 59. Mecanismo de formação do furfural, 5-HMF e formaldeído a partir da pirólise da frutose [Paine III, Pithawalla & Naworal, 2008].

A manga é uma fruta rica em carboidratos (frutose e glicose) e estes compostos, ao apresentarem grande afinidade pela fase de recobrimento da fibra, são extraídos eficientemente. Na etapa da dessorção térmica, realizada a 280°C no injetor do cromatógrafo a gás, ocorre a pirólise destes carboidratos levando à formação do 5-HMF, proporcionando assim uma elevada intensidade no sinal analítico deste interferente, como pode ser observado no cromatograma apresentado na Figura 51.

Para a confirmação do exposto, foram realizadas extrações por DI-SPME em um extrato da matriz e análises por HPLC-UV-Vis, tendo em vista que a dessorção na interface de acoplamento SPME-HPLC ocorre à temperatura ambiente e não provoca a pirólise dos carboidratos. Para conhecer o tempo de retenção do 5-HMF foram feitas injeções diretas do padrão em diferentes concentrações. A eluição ocorreu em coluna C₁₈ (250 mm x 2.1 mm I.D, 5µm) com uma mistura isocrática de metanol e água (20:80 v/v) com fluxo de 0,25 mL min⁻¹. O detector UV-Vis operou em 285 nm. A Figura 60 mostra a sobreposição de dois cromatogramas obtidos por HPLC-UV-Vis com a injeção direta do padrão de 5-HMF em diferentes concentrações para a confirmação do tempo de retenção.

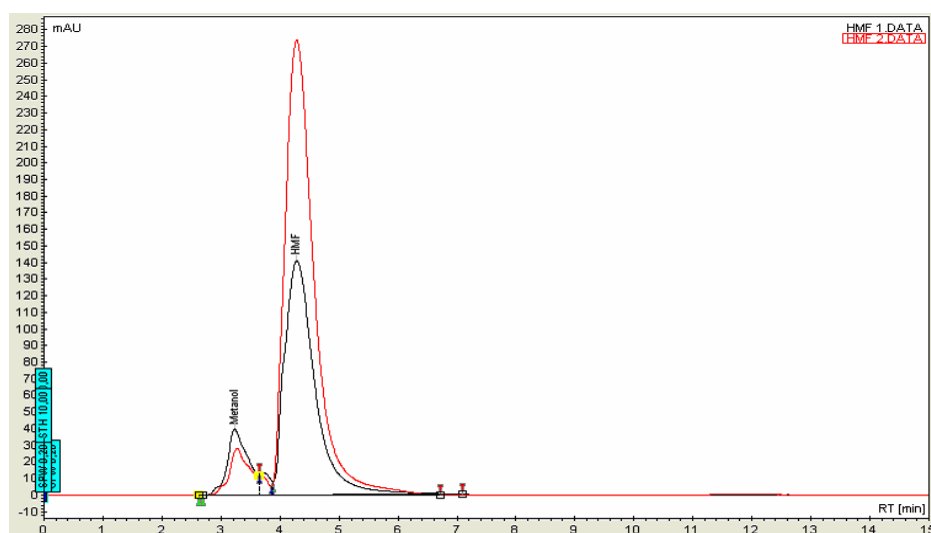


Figura 60. Cromatograma obtido por HPLC-UV-Vis na injeção de 20,0 µL de 5-HMF nas concentrações de 0,5 mg L⁻¹ (Preto) e 1,0 mg L⁻¹ (Vermelho). Eluição no modo isocrático (Metanol:água, 20:80 v/v) com coluna C₁₈ (250 mm x 2.1 mm I.D, 5µm) e leitura a 285 nm.

A Figura 61 mostra um cromatograma obtido por DI-SPME-HPLC-UV-Vis de um extrato da matriz, com as condições de eluição e detecção descritas anteriormente. Analisando o cromatograma pode-se observar a presença do 5-HMF, indicando assim que o composto já estava presente na matriz. Porém, a quantidade de 5-HMF é acentuadamente alterada quando ocorre a dessorção térmica no injetor do GC provocando a pirólise de carboidratos, tendo em vista que o sinal analítico produzido na detecção por GC é muito superior ao obtido por HPLC.

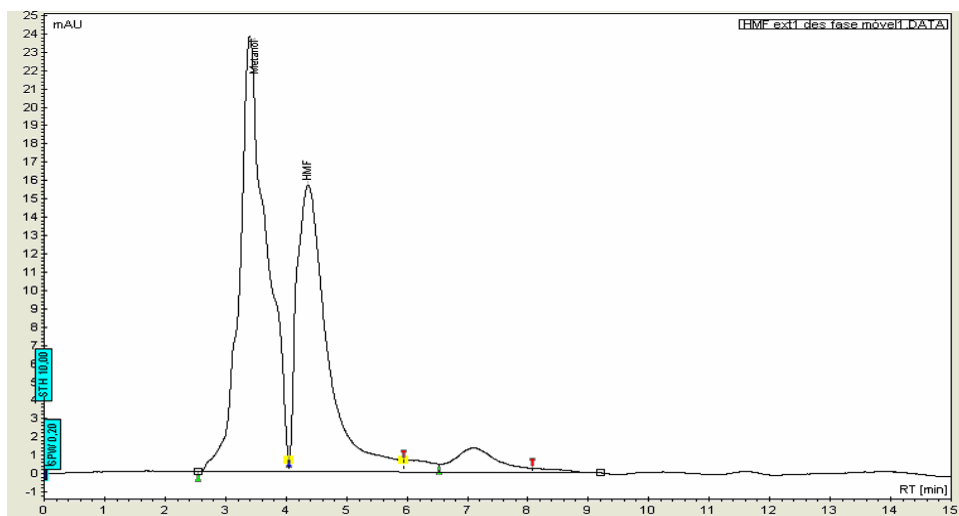


Figura 61. Cromatograma obtido por DI-SPME-HPLC-UV-Vis, dessorção dinâmica com a fase móvel. Eluição no modo isocrático (Metanol:água 20:80 v/v) com coluna C₁₈ (250 mm x 2.1 mm I.D, 5µm) e detector (285 nm).

6. Conclusões

Os resultados mostram que o método desenvolvido com extração por DI-SPME e análise por GC-MS pode ser aplicado em análises qualitativas e quantitativas de resíduos de agrotóxicos em manga. A combinação da SPME com a análise por GC-MS permitiu o desenvolvimento de um método eficiente, seletivo e sensível para a determinação de resíduos dos agrotóxicos clofentezina, carbofuran, diazinona, parationa metílica, malationa, fentiona, tiabendazol, imazalil, bifentrina, permetrina, procloraz, piraclostrobina, difenoconazol e azoxistrobina em amostras de manga.

A validação do método por DI-SPME e GC-MS apresentou linearidade entre 3,33 e 1665,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com limites de detecção e quantificação entre 1,0 e 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 3,33 e 33,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. No estudo da precisão e exatidão foram obtidos resultados satisfatórios, dentro dos limites estabelecidos para a análise de traços.

A aplicação do método desenvolvido em amostras de mangas, comercializadas na cidade de Salvador-BA, mostrou a presença de resíduos de carbofuran, permetrina, parationa metílica, malationa e tiabendazol. Além disso, em todas as amostras foram detectados resíduos de bifentrina e azoxistrobina.

Os resultados obtidos por DI-SPME e HPLC-UV-Vis mostraram que esta combinação é apropriada para a determinação simultânea dos agrotóxicos tiabendazol, carbofuran, azoxistrobina, procloraz, fentiona, clofentezina, permetrina, abamectina, carbosulfan e bifentrina, com boa seletividade, linearidade entre 2,0 e 250,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e limites de detecção e quantificação entre 0,6 e 3,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 2,0 e 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. O estudo da precisão e exatidão também mostrou resultados satisfatórios para análise de traços.

A aplicação desse método em amostras de mangas, comercializadas na cidade de Aracaju/SE, permitiu a detecção de resíduos de azoxistrobina, fentiona, abamectina, bifentrina e permetrina. Além disso, que a permetrina foi o composto presente no maior número de amostras, e com maiores concentrações. Entretanto, deve-se ressaltar que o uso deste composto no cultivo da manga, não autorizado pela ANVISA.

As análises das amostras coletadas em Salvador apresentaram predominantemente resíduos de azoxistrobina e bifentrina e as coletadas em Aracaju resíduos de permetrina e bifentrina. Azoxistrobina é um fungicida sistêmico amplamente utilizado para o combate da

antracnose e a bifentrina e permetrina são inseticidas e acaricidas com amplo espectro de ação.

Apesar das concentrações individuais encontradas serem menores que os valores estabelecidos pela legislação brasileira, o somatório destas concentrações é algo preocupante, tendo em vista que não há estudos sobre os efeitos sinérgicos da mistura desses agrotóxicos. Os resultados obtidos demonstram a necessidade do monitoramento de resíduos dos agrotóxicos em frutas pelos poderes públicos, como forma de resguardar e preservar a saúde pública e o meio ambiente.

Durante o desenvolvimento do método foi observado a presença de um interferente da matriz que foi investigado e identificado como 5-hidroxi-metilfurfural. Para a identificação, foi fundamental a utilização do sistema GC-MS/MS que fornece maiores informações estruturais para a confirmação.

7. Perspectivas para trabalhos futuros

Realizar novos estudos com as metodologias desenvolvidas em outras frutas produzidas na região estudada, tais como goiaba e maracujá.

Aplicação da metodologia desenvolvida em um programa de monitoramento para avaliar os níveis de concentração dos agrotóxicos estudados em amostras de manga comercializados na cidade de Salvador e Aracaju.

Realizar estudos visando a determinação das concentrações dos agrotóxicos na fruta, em função do tempo de aplicação.

Realizar estudo para comparar os níveis de concentração dos agrotóxicos em frutas, após serem submetidos a diferentes processos de lavagem.

8. Referências Bibliográficas

Ahmed, F.E. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. **Trends Analytical Chemistry**, v. 20, p. 649–61, 2001.

Albero, B.; Sánchez-Brunete, C.; Tadeo, J. L. Multiresidue determination of pesticides in juices by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta** v. 66, p. 917–924, 2005.

Alpendurada, M. F. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 889, p. 3-14, 2000.

Ameur, L. A.; Trytram, G.; Birlouez-Aragon, I. Accumulation of 5-hydroxymethyl-2-furfural in cookies during the baking process: Validation of na extraction method. **Food Chemistry**. v. 98, p. 790-796, 2006.

ANVISA (a), Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 2, p. 361-363, 2006.

ANVISA – Monografia da cultura da manga. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm> (Acesso em 18/03/2008).

Araújo, A.C.P.; Telles, D. L.; Gorni, R.; Lima, L.L.A. Endosulfan residues in Brazilian tomatoes and their impact on public health and the environment. **Environmental Contamination and Toxicology**. v. 62, p. 671-676, 1999.

Arthur, C. L.; Pawliszin, J. SPME with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v.60, p. 2145-2148, 1990.

Barbosa, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2004.

Arthur, C. L.; Killam, L.; Buchholz, K. D.; Pawliszyn, J. Automation and optimization of SPME. **Analytical Chemistry**, v. 64, p. 1960-1966, 1992.

Beyer, A.; Biziuk, M. Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. **Food Chemistry**. v. 108, p. 669-680, 2008.

Basheer, C.; Alnedhary, A. A.; Rao, B. S. M.; Lee, H. K. Determination of carbamate pesticides using micro-solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, V. 1216, P. 211-216, 2009.

Benitez, F. J.; Acero, J. L.; Real, F. J.; Degradation of carbofuran by using ozone, UV radiation and advanced oxidation process. **Journal of Hazardous Materials B**, 89, 51–65, 2002.

Bernal, J. L.; Nozal, M^a. J. del; Jiménez, J. J.; Rivera, J. M^a. Matriz effects in the determination of acaricides and fungicides in must by gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection. **Journal of chromatography A**, v. 778, p. 111-117, 1997.

Berrada, H.; Font, G.; Molto, J.C. Application of solid-phase microextraction for determining phenylurea herbicides and their homologous anilines from vegetables. **Journal Chromatography A**, v. 1042, p. 9-14, 2004.

Bertelli, D.; Papotti, G.; Lolli, M.; Sabatini, A. G.; Plessi, M. Development of an HS-SPME-GC method to determine the methyl anthranilate in Citrus honeys. **Analytical Methods**, v. 108, p. 297-303, 2008.

Blasco, C.; Picó, Y.; Mañes, J.; Font, G. Determination of fungicide residues in fruits and vegetables by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 947, p. 227-235, 2002.

Bolognesi, C.; Morasso, G. Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. **Trends in Food Science and Technology**, 11, 182-187, 2000.

Bonino, M.; Schellino, R.; Rizzi, C.; Aigotti, R.; Delfini, C.; Baiocchi, C. Aroma compounds of an Italian wine (*Ruché*) by HS-SPME analysis coupled with GC-ITMS. **Food Chemistry**, v. 80, p. 125-133, 2003.

Brandão, M. C. C.; Maia, G. A.; Lima, D. P.; Parente, E. J. de Sá.; Campello, C. C.; Nassu, R. T.; Feitosa, T.; de Sousa, P. H. M. Análise físico-química, microbiológica e sensorial de frutos de manga submetidos à desidratação osmótico-solar. **Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal**, v. 25, n. 1, 38-41, 2003.

Brasil, Artigo 94 do decreto 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o “Sistema Integrado de Informações sobre Agrotóxicos” disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16764> (Acesso em: 23/07/2009)

Brasil, Decreto n.4074 de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei n. 7.802 de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento. (Acesso em 20.09.2007)

Brasil, Ministério da Agricultura, disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/> (acesso em: 23/09/2009).

Brito, N. M.; de Amarante Junior, O. P.; Polese, L.; dos Santos, T. C. R.; Ribeiro, M. L. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas

mediante ensaios de recuperação. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 155-168, 2002.

Brunini, M. A.; Durigan, J. F.; Oliveira, A. L. Avaliação das alterações em polpa de manga “Tommy-Atkins” congeladas. **Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal**, v. 24, n. 3, 651-653, 2002.

Bull, D.; Hathaway, D. **Pragas e venenos: agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo**. Petrópolis: Vozes, 1986.

Cabrera, L.; Costa, F. P.; Primel, E. G.; Estimativa de riscos de contaminação das águas por pesticidas na região sul do Estado do RS. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p.1982–1986, 2008.

Cai, L.; Gong, S.; Chen, M.; Wu, C. Vinyl crown ether as a novel crosslinked sol-gel SPME fiber for determination of organophosphorus pesticides in food sample. **Analytica Chimica Acta**, v. 559, p. 89-96, 2006.

Caraliere, M. J.; Calore, E. E.; Perez, N. M.; Puga, F. R. Miotoxicidade por organofosforados. **Revista de Saúde Pública**, v. 30, n. 3, p. 67-71, 1996.

Chai, M. K.; Tan, G. H. Validation of a headspace solid-phase microextraction procedure with gas chromatography-electron capture detection of pesticide residues. **Food Chemistry**, v. 117, p. 561-567, 2009.

Chu, Xiao-G.; Hu, Xiao-Z.; Yao, Hui-Y. Determination of 266 pesticides residues in apple by matrix solid-phase dispersion and gás chromatography-mass selective detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1063, p. 201-210, 2005.

Cortés-Aguado, S.; Sánchez-Morito, N.; Arrebola, F. J.; Frenich, A. G.; Vidal, J. L. M. Fast screening of pesticide residues in fruit juice by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1314-1325, 2008.

Currie, L. A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p. 127-134, 1999.

Diserens, H.; Henzelin, M. Determination of abamectin residues in fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 833, p. 13-18, 1999.

Doong, R.A.; Liao, P.L. Determination of organochlorine pesticides and their metabolites in soil samples using headspace solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 918, p. 177-188, 2001.

Dong, C.; Zeng, Z.; Li, X. Determination of organochlorine pesticides and their metabolites in radish after headspace solid-phase microextraction using calix[4]arene fiber. **Talanta**, v. 66, p. 721-727, 2005.

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

Dos Santos, V. M.; Donnici, C. L.; Da Costa, J. B. N.; Caixeiro, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: Histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais, **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 159-170, 2007.

Dugay, J.; Miège, C.; Hennion, M. C. Effect of the various parameters governing solid-phase microextraction for the trace-determination of pesticides in waters. **Journal of Chromatography A**, v. 795, p. 27-42, 1998.

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

Embrapa (a) Mandioca e Fruticultura Tropical, disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/newsletter/ler_materia.php?codnoticia=110&codedicao=21 (Acesso em 18/09/2009).

Embrapa (b) Semi-Árido, disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/so_cioeconomia.htm (Acesso em 29/09/2009)

Estadão, disponível em: http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20090807/not_imp414820,0.php (Acesso em 11/10/2009).

Farajzadeh, M. A.; Hatami, M. Solid-phase microextraction gas chromatography for determination of some organophosphorus pesticides. **Chromatography**, v. 59, p. 259-262, 2004.

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

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

Fernandez-Alvarez, M.; Llompart, M.; Lamas, P.; Lores, M.; Garcia-Jares, C.; Cela, R.; Dagnac, T. Development of a solid-phase microextraction gas chromatography with microelectron-capture detection method for a multiresidue analysis of pesticides in bovine milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 617, p. 37-50, 2008.

Ferrer, E.; Alegría, A.; Farré, R.; Abellán, P.; Romero, F. High-performance liquid chromatographic determination of furfural compounds in infant formulas Changes during heat treatment and storage. **Journal of Chromatography A**, v. 947, p. 85-95, 2002.

Fytianos, K.; Raikos, N.; Theodoridis, G.; Velinova, Z.; Tsoukali, H. Solid phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in fruits, **Chemosphere**, v. 65, p. 2090-2095, 2006.

Flores, G.; Del Castillo, M. L. R.; Blanch, G. P.; Herraiz, M. Effect of sample freezing on the SPME performance in the analysis of chiral volatile compounds in foods. **Food Chemistry**, v. 96, p. 334-339, 2006.

Galli, A.; Souza, D.; Garbellini, G. S.; Coutinho, C. F. B.; Mazo, L. H.; Avzca, L. A.; Machado, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.

Gaynor, A. A contaminação do solo com pesticidas. Disponível em: <http://www.agriculturaurbana.org.br/RAU/AU3/AU3pesticidas.html> (Acesso em 21/12/2007)

González, A. G.; Herrador, M. A.; Asuero, A. G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. **Talanta**, v. 48, p. 729-736, 1999.

García-Villanova, B.; Guerra-Hernández, E.; Martínez-Gómez, E.; Montilla, J. Liquid Chromatography for the Determination of 5-(Hidroxymethyl)-2-furaldehyde in Breakfast Cereals. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. V. 41, p. 1254-1255, 1993.

Gaspar, E. M. S. M & Lopes, J. F. Simple gás chromatographic method for furfural analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2762 – 2767, 2009.

Harris, D. C. **Análise Química Quantitativa** – Rio de Janeiro: Ed. LTC, 7ª ed, 2008.

Hernández-Borges, J.; Ravelo-Pérez, L. M.; Hernández-Suárez, E. M.; Camero, A.; Rodríguez-Delgado, M. A. Analysis of abamectin residues in avocados by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1165, p. 52-57, 2007.

Huang, S.; Huang, H.; Sung, Y. Analysis of triazine in water samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography, **Talanta**, v. 64, p. 887-893, 2004.

Ibraf – Instituto Brasileiro de Fruticultura, disponível em: <http://www.ibraf.org.br/estatisticas/ProducaoBrasileiradeFrutasporEstado2007.pdf> (Acesso em 23/09/2009)

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, **DOG-CGCRE-008**, 2007.

IUPAC: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/index2.htm> (Acesso em 25/11/08)

Junqueira, N. T. V.; Chaves, R. C.; Nascimento, A. C.; Ramos, V. H. V.; Peixoto, J. R.; Junqueira, L. P. Efeito do óleo de soja no controle da antracnose e na conservação da manga Cv. Palmer em pós-colheita. **Revista Brasileira de Fruticultura Jaboticabal**, v. 26, n. 2, p. 222-225, 2004.

Kleeberg, K.K.; Liu, Y.; Jans, M.; Schlegelmilch, M.; Streese, J.; Stegmann, R. Development of a simple and sensitive method for the characterization of odorous waste gas emissions by means of solid-phase microextraction (SPME) and GC-MS/oftactometry. **Waste Management**, v. 25, p. 872-879, 2005.

Kolar, L.; Erzen, N. K.; Hogerwerf, L.; van Gestel, C. A. M. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. **Environmental Pollution**, v. 151, p. 182-189, 2008.

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

Lachenmeier, D. W; Nerlich, U; Kuballa, T. Automated determination of ethyl carbamate in stone-fruits spirits using headspace solid-phase microextractio and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1108, p. 116-120, 2006.

Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A. Headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry for the rapid screening of organophosphorus insecticide residues in strawberries and cherries. **Journal of chromatography A**, v. 993, p. 197-203, 2003.

Lambropoulou, D. A.; Konstantinou, I. K.; Albanis, T.A. Determination of fungicides in natural waters using solid-phase microextraction and gás chromatography coupled with electron-capture and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 893, p. 143-156, 2000.

Lambropoulou, D. A.; Albanis, T.A. Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 195-228, 2007.

Larini, L. **Toxicologia**, Editora Manole, São Paulo, 1981.

Liu, M.; Hashi, Y.; Song, Y.; Lin, J.M. Simultaneous determination of carbamate and organophosphorus pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1097, p. 183-187, 2005.

Magdic, S.; Boyd-Boland, A.; Jinno, K.; Pawliszyn, J. Analysis of organophosphorous insecticides from environmental samples by SPME. **Journal of chromatography A**, v. 736, n. 1, p. 219-228, 1996.

Masten, S. J.; Tian, M.; Upham, B. L.; Trosko, J. E.; Efect of selected pesticides and their ozonation by products on gap junctional intercellular communication using rate liver epithelial cell lines. **Chemosphere**, v. 44, n. 3, p. 457-465, 2001.

Medeiros, F. R. **Análise de COV por HS-MEFS acoplada a CGAR-EM**. Salvador, 2008. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia.

Menezes Filho, A. **Desenvolvimento, aplicação de metodologia para a determinação de resíduos de pesticidas em tomate por dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)**. Aracaju, 2005. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe.

Menezes Filho, A.; Navickiene, S.; Dórea, H. S. Development of MSPD Method for the Determination of Pesticides Residues in Tomato by GC-MS. **Journal Brazilian Chemistry Society**. v. 17, n. 5, p. 874-879, 2006.

Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace SPME analysis of volatile sulphides and disulphides in wine aroma. **Journal of Chromatography A**. v. 808, p. 211-218, 1998.

Millán, S.; Sampedro, M. C.; Unceta, N.; Goicolea, M. A.; Rodriguez, E.; Barrio, R. J. Coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for direct and sensitive determinations of halogenated fungicides in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 995, p. 135-142, 2003.

Moraes, S. L.; Rezende, M. O. O.; Nakagawa, L. E.; Luchini, L. C. Análise de resíduos de pesticidas em tomates por cromatografia em camada delgada, **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 196-202, 2002.

Moreira, J. C.; Jacob, S. C.; Peres, F.; Lima, J. C.; Meyer, A.; Oliveira-Silva, J. J.; Sarcinelli, P. N.; Batista, D. F.; Egler, M.; Faria, M. V. C.; Araújo, A. J.; Kubota, A. H.; Soares, M. O. Alves, S. R.; Moura, C. M.; Curi, R. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 2, p. 299 – 311, 2002.

Muccio, A. D.; Fidente, P.; Barbini, D. A.; Dommarco, R. Seccia, S. Morrica, P. Application of solid-phase extraction and liquid-chromatography-mass spectrometry to the determination of neonicotinoid pesticide residues in fruits and vegetables, **Journal of Chromatography A**, v. 1108, p. 1-6, 2006.

Navarro, M.; Picó, Y.; Marín, R.; Mañes, J. Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of a new generation of fungicides in fruits and vegetables. **Journal of chromatography A**, v. 968, p. 201 – 209, 2002.

Nijhuis, A.; Knaap, H. C. M. Van der; Jong, S. de; Vandeginste, B. G. M. Strategy for ruggedness tests in chromatographic method validation. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p. 187-202, 1999.

Otero, R. R.; Grande. B. C. Gándara, J. S. Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid-liquid and solid-phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 992, p. 121-131, 2003.

Oviedo, M. T. P.; Toledo, M. C. F.; Vicente, E. Resíduos de agrotóxicos piretróides em hortaliças, **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 9-18, jan/dez. 2003.

Paine III, J. B.; Pithawalla, Y. B.; Naworal, J. D. Carbohydrate pyrolysis mechanisms from isotopic labeling Part 4. The pyrolysis of d-glucose: The formation of furans. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. V. 83, p. 37-63, 2008.

Patel, K.; Fussel, R. J.; Hetmanski, M.; Goodall, D. M. Keely, B. J. Evaluation of gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry for the determination of organochlorine pesticides in fats and oils. **Journal of Chromatography A**, v. 1068, p. 289-296, 2005.

Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction, theory and practice. Wiley-VCH, New York, 1997.

Picó, Y.; Fernández, M.; Ruiz, M. J.; Font, G. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods** v. 70, p. 117-131, 2007.

Pizzutti, I. R. **Validação de métodos multirresíduos de extração e desenvolvimento de método de purificação por GPC para análise de resíduos de pesticidas em soja utilizando GC-MS, GC-MS/MS e LC-MS/MS**. Santa Maria, 2006. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

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

Pozo, O. J.; Marin, J. M.; Sancho, J. V.; Hernández, f. Determination of abamectin and azadirachtin residues in orange samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 992, p. 133 – 140, 2003.

Queiroz, M. E. C.; Lanças, F. M. Análise de fármacos em material biológico e acoplamento da microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**. v. 28, n. 5, p. 880-886, 2005.

Quinteiro, L. M. C.; Nobre, A. L. R.; Ferreira, A. B.B.; Godoy, R. L. O.; Castro, I. M. Microextração em Fase Sólida: Fundamentos e aplicações em análise de alimentos. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 1-30, 2003.

Rada-Mendoza, M.; Sanz, M. L.; Olano, A.; Villamiel, M. Formation of hidroxymethylfurfural and furosine during the storage of jams and fruit-based infant foods. **Food Chemistry**, v. 85, p. 605-609, 2004.

Rada-Mendoza, M.; Olano, A.; Villamiel, M. Determination of hidroxymethylfurfural in commercial jams and in fruit-based infant foods. **Food Chemistry**, v. 79, p. 513-516, 2002.

Resíduos de pesticidas. Disponível em: http://www.gipescado.com.br/arquivos/met_fis-qui_ial/cap20.pdf (Acesso em 15/09/2009).

Reto, M.; Figueira, M. E.; Filipe, H. M.; Almeida, C. M. M. Analysis of vitamin K in green tea leafs and infusions by SPME-GC-FID. **Food Chemistry**, v. 96, p. 334-339, 2006.

Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

Riu-Aumatell, M.; Castellari, M.; López-Tamames, E.; Galassi, S.; Buxaderas, S. Characterisation of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS. **Food Chemistry**, v. 87, p. 627-637, 2004.

Riu-Aumatell, M. **Caracterización de Compuestos Volátiles en Bebidas Derivadas de Fruta**. Barcelona, Espanha, 2005. Tese (Doutorado em Química) - Universitat de Barcelona.

Sagrati, G.; Mañes, J.; Giardiná, D.; Damiani, P.; Picó, Y. Analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1147, p. 135-143, 2007.

Sánchez-Ortega, A.; Sampedro, M. C.; Unceta, N.; Goicolea, M. A.; Barrio, R. J. Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography using on-line diode-array and electrochemical detection for the determination of fenitrothion and its main metabolites in environmental water samples, **Journal of Chromatography A**, v. 1094, p. 70-76, 2005.

Schurek, J.; Portolés, T.; Hajslova, J.; Riddellova.; Hernández, F. Application of head-space solid-phase microextraction coupled to comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the determination of multiple pesticides residues in tea samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 611, p. 163-172, 2008.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5ª ed. Porto Alegre; Ed. Bookman, 2002.

SEAGRI – Secretária da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária do Estado da Bahia. Disponível em <http://www.seagri.ba.gov.br/Manga.htm> (Acesso em 23/04/2009).

Silva, M. G. D.; Aquino, A.; Dórea, H. S.; Navickiene, S. Simultaneous determination of eight pesticide residues in coconut using MSPD and GC/MS. **Talanta**, v. 76, p. 680-684, 2008.

Silva, C. M. M. de S.; de Melo, I. S. Biodegradação de fungicidas benzimidazóis. EMBRAPA e CNPMA. Disponível em:

http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Melo_BiodegradacaoFungicidasBenzimidazois_000fdqbaqe302wx5eo0a2ndxyjebw1mn.pdf (Acesso em: 12/11/2009)

Silva, R. A.; Oliveira, A. B.; Felipe, E. M. F.; Neres, F. P. T. J.; Maia, G. A.; Da Costa, J. M. C. Avaliação físico-química e sensorial de néctares de manga de diferentes marcas comercializadas em Fortaleza/CE. **Publ. UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng., Ponta Grossa**, v. 11, n. 3, p. 21-26, 2005.

Simplício, A. L.; Vilas Boas, L. Validation of solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits juice. **Journal of Chromatography A**, v. 833, p. 35-42, 1999.

SINDAG, Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola, disponível em: http://www.sindag.com.br/dados_mercado.php (Acesso em 08/10/2009).

Sobrinho, L. L.; Dórea, H.S. Analysis of pesticide residues in rice using matrix solid-phase dispersion (MSPD). **Journal of The Brazilian Chemistry Society**, v.15, n. 5, p. 690-694, 2004.

Stajnbaher, D.; Zupancic-Kraj, L. Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, p. 185-198, 2003.

Stubberud, K. P.; Astrom, O. Separation of ibuprofen, codeine phosphate, their degradation products and impurities by capillary electrophoresis: II Validation. **Journal Chromatography A**, v. 826, p. 95-102, 1998.

Tahboub, Y. R.; Zaater, M. F.; Al-Talla, Z. A. Determination of the limits of identification and quantification of selected organochlorine and organophosphorus pesticide residues in surface water by full-scan gas chromatography/mass spectrometry. **Journal Chromatography A**, v. 1098, p. 150-155, 2005.

Tahmasseb, L. A.; Nélieu, S.; Kerhoas, L.; Jueinhorn, J; Ozonation of chlorophenylurea pesticides in water: reaction monitoring and degradation pathways. **The Science of the Total Environment**, v. 291, p. 33-44, 2002.

Valente, A. L. P.; Augusto, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

Veneziano, A.; Vacca, G.; Arana, S.; De Simone, F.; Rastrelli, L. Determination of carbendazim, thiabendazole and thiophanate-methyl in banana (*Musa acuminata*) samples imported to Italy. **Food Chemistry**, v. 87, p. 383-386, 2004.

Vázquez, P. P.; Mughari, A. R.; Galera, M. M. Solid-phase microextraction (SPME) for the determination of pyrethroids in cucumber and watermelon using liquid chromatography combined with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 607, p. 74-82, 2008.

Viñas, P.; Campillo, N.; Hernández-Pérez, M.; Hernández-Córdoba, M. A comparison microextraction and stir bar sorptive extractive coupled to liquid chromatography for the rapid analysis of resveratrol isomers in wines, musts and fruit juices. **Analytica Chimica Acta**, v. 611, p. 119-125, 2008.

Viñas, P.; Campillo, N.; Martínez-Castillo, N.; Hernández-Córdoba, M. Method development and validation for strobilurin fungicides in baby foods by solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 140–146, 2009.

Wang, D.; Weston, D. P.; Lydy, M. J. Method development for the analysis of organophosphate and pyrethroid insecticides at low parts per trillion levels in water, **Talanta**, v.78, p. 1345–1351, 2009.

Wang, Y.; Yang, C.; Li, S.; Yang, L.; Wang, Y.; Zhao, J.; Jiang, Q. Volatile characteristics of 50 peaches and nectarines evaluated by HP-SPME with GC-MS. **Food Chemistry**, v. 116, p. 356-364, 2009.

Wu, J.; Luan, T.; Lan, C.; Lo, T. W. H.; Chan, G. Y. S. Removal of residual pesticides on vegetable using ozonated water. **Food Control**, v. 18, p. 466-472, 2007.

Yassaa, N.; Willians, J. Analysis of enantiomeric and non-enantiomeric monoterpenes in plant emissions using portable dynamic air sampling/solid-phase microextraction (PDAS-SPME) and chiral gas chromatography/mass spectrometry. **Atmospheric Environmental**, v. 39, p. 4875-4884, 2005.

Zambonin, C. G.; Cilenti, A.; Palmisano, F. Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the rapid screening of triazole residues in wine and strawberries. **Journal of Chromatography A**, v. 967, p. 255-260, 2002.

Zambonin, C. G.; Quinto, M.; De Vietro, N.; Palmisano, F. Solid-phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry: A fast and simple screening method for the assessment of organophosphorus pesticides residues in wine and fruit juices. **Food Chemistry**, v. 86, p. 269-274, 2004.

Zeng, J.; Chen, J.; Lin, Z.; Chen, W.; Chen, X.; Wang, X. Development of polymethylphenylsiloxane-coated fiber for solid-phase microextraction and its analytical application of qualitative and semi-quantitative of organochlorine and pyrethroid pesticides in vegetables. **Analytica Acta**, v. 619, p. 59-66, 2008.

Zhang, Z.; Yang, M.J.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction. **Analytical Chemical**, v. 66, p. 844-853, 1994.

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

Zroslikova, J.; Hajslová, J.; Godula, M.; Mastovská. Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 937, p. 73 – 86, 2001.

A N E X O S



Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC–MS) for the determination of pesticide residues in mangoes

Adalberto Menezes Filho^{a,b}, Fábio Neves dos Santos^a, Pedro Afonso de Paula Pereira^{a,*}

^aInstituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Campus Universitário de Ondina, 40, 170-290 Salvador, BA, Brazil

^bInstituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia de Sergipe, 49, 044-260 Aracaju, SE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 July 2009

Received in revised form 8 December 2009

Accepted 9 December 2009

Available online 16 December 2009

Keywords:

Mangoes

Pesticide residues

SPME

GC–MS

ABSTRACT

A method was developed for the simultaneous analysis of 14 pesticide residues (clofentezine, carbofuran, diazinon, methyl parathion, malathion, fenthion, thiabendazole, imazalil, bifenthrin, permethrin, prochloraz, pyraclostrobin, difenoconazole and azoxystrobin) in mango fruit, based on solid-phase micro extraction (SPME) coupled to gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). Different parameters of the method were evaluated, such as fiber type, extraction mode (direct immersion and headspace), temperature, extraction and desorption times, stirring velocities and ionic strength. The best results were obtained using polyacrylate fiber and direct immersion mode at 50 °C for 30 min, along with stirring at 250 rpm and desorption for 5 min at 280 °C. The method was validated using mango samples spiked with pesticides at concentration levels ranging from 33.3 to 333.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The average recoveries ($n=3$) for the lowest concentration level ranged from 71.6 to 117.5%, with relative standard deviations between 3.1 and 12.3%, respectively. Detection and quantification limits ranged from 1.0 to 3.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and from 3.33 to 33.33 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. The optimized method was then applied to 16 locally purchased mango samples, all of them containing the pesticides bifenthrin and azoxystrobin in concentrations of 18.3–57.4 and 12.7–55.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively, although these values were below the MRL established by Brazilian legislation. The method proved to be selective, sensitive, and with good precision and recovery rates, presenting LOQ below the MRL admitted by Brazilian legislation.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The mango is a fruit whose attractive flavor, aroma, color and exotic appearance have gained wide acceptance and led to its high demand in both domestic and export markets, making it a product of increasing economic importance. Its popularity is enhanced by the fact that it is rich in carotenoids, mineral salts, carbohydrates, ascorbic acid and B vitamins [1]. Ripe mangoes contain a considerable amount of vitamin C, which may reach up to 110 mg/100 g of fruit, depending on the variety. Mango production in Brazil is destined primarily for the export markets of Europe and North America [2]. To increase its productivity and obtain good quality fruits, phytosanitary treatments are applied for pest and fungal control during the cultivation and post-harvest stages. The fruit is subject to several diseases during these stages, leading to significant losses, the

most important of which is anthracnosis caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. The treatment involves the use of contact and systemic fungicides [3] and, after harvesting, immersion of the fruit in water containing fungicides such as thiabendazole [4]. Albeit effective in controlling pests and fungi, pesticides may penetrate the vegetable tissues, remaining in the fruit as residues and posing a potential risk to human health due to their toxicity [5]. To control the levels of residual pesticides in foods, several countries have established maximum residue limits (MRLs) of each active principle as a form of protecting the health of the population.

Environmental and food samples are usually not analyzed without a preliminary preparation, since contaminants are present in low concentrations and the matrices are complex [6]. Preparation of the sample is the most critical step in the determination of pesticide residues in foods, since biological samples present complex chemical compositions, requiring extraction techniques that allow for greater selectivity and concentration of the analytes, allowing for the determination of pesticide residues at increasingly low levels.

Conventional methods for the determination of pesticide residues in foods are laborious and time-consuming, requiring considerable amounts of organic solvents and extracting undesirable

* Corresponding author at: Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Geremoabo s/n, Campus Universitário de Ondina, 40, 170-290, Salvador, BA, Brazil. Tel.: +55 71 3283 6879; fax: +55 71 3237 5524.

E-mail address: pedroapp@ufba.br (P.A. de Paula Pereira).



Contents lists available at ScienceDirect

Microchemical Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/microc

Development, validation and application of a method based on DI-SPME and GC-MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and groundwater samples

Adalberto Menezes Filho^{a,b}, Fábio Neves dos Santos^a, Pedro Afonso de P. Pereira^{a,c,d,*}

^a Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Campus Universitário de Ondina, 40170-290 Salvador, BA, Brazil

^b Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IF), 49055-260 Aracaju, SE, Brazil

^c CIEnAm – Centro Interdisciplinar de Energia e Ambiente – Salvador, BA, Brazil

^d INCT – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Energia e Ambiente – Salvador, BA, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 November 2009

Received in revised form 23 February 2010

Accepted 24 February 2010

Available online xxxxx

Keywords:

Water

Pesticides

SPME

GC-MS

ABSTRACT

A simple and rapid method based on solid-phase micro extraction (SPME) technique followed by gas chromatography–mass spectrometry with selected ion monitoring (GC-MS, SIM) was developed by the simultaneous determination of 16 pesticides of seven different chemical groups [Six organophosphorus (trichlorfon, diazinon, methyl parathion, malathion, fenthion and ethion), three pyrethroids (bifenthrin, permethrin, cypermethrin), two imidazoles (imazalil and prochloraz), two strobilurins (azoxystrobin and pyraclostrobin), one carbamate (carbofuran), one tetrazine (clofentezine), and one triazole (difenoconazole)] in water. The pesticides extraction was done with direct immersion mode (DI-SPME) of the polyacrilate fiber (PA 85 μm). The extraction temperature was adjusted to 50 °C during 30 min, while stirring at 250 rpm was applied. After extraction, the fiber was introduced in the GC injector for thermal desorption for 5 min. at 280 °C. The method was validated using ultra pure water samples fortified with pesticides at different concentration levels and shows good linearity in the concentrations between 0.05 and 250.00 ng mL^{-1} . The LOD and LOQ ranged, from 0.02 to 0.30 ng mL^{-1} and 0.05 to 1.00 ng mL^{-1} , respectively. Intra-day and inter-day precisions were determined in two concentration levels (5.00 and 50.00 ng mL^{-1}). Intra-day relative standard deviation (%R.S.D.) ranged between 3.6 and 13.6%, and inter-day (%R.S.D.) ranged between 6.3 and 18.5%. Relative recovery tests were carried out spiking the ultra pure sample with standards in three different concentration levels 0.20, 5.00 and 50.00 ng mL^{-1} . The recovery at 0.20 ng mL^{-1} level varied from 86.4 \pm 9.4% to 108.5 \pm 10.5%, at 5.00 ng mL^{-1} level varied from 77.5 \pm 10.8% to 104.6 \pm 9.6% and at 50.00 ng mL^{-1} level varied from 70.2 \pm 4.6% to 98.4 \pm 8.5%. The proposed SPME method was applied in twenty-six water samples collected in the "Platô de Neópolis", State of Sergipe, Brazil. Methyl parathion was detected in five samples with an average concentration of 0.17 ng mL^{-1} and bifenthrin, pyraclostrobin and azoxystrobin residues were found in three samples with average concentrations of 2.28, 3.12 and 0.15 ng mL^{-1} , respectively.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pesticides are widely used in pest control in agriculture with the objective of increasing agricultural productivity. It is one of the sources of water contamination with serious risks to human and animal health. Additionally, it causes changes in the ecosystem with harmful consequences for the environment and agriculture, due to the emergence and spread of new pests and disease with consequent increasing in the need for using more pesticides [1]. Due to the intensive use of pesticides and the persistence of these compounds,

residues can be found in different environmental compartments, including groundwater and surface water [2]. Water resources are the most affected due to agriculture requires a water supply, leading the development of this activity to areas close to rivers and lakes [3].

For the control of level concentration of pesticide residues in water, the Ministry of Health in Brazil established the Value Maximum Allowable by decree no. 518 on March 25, 2004 [4]. For environmental and drinking water, the maximum admissible concentration of a single compound established by the European Union (EU) is 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$, and 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ is the maximum allowed for the total concentration of all pesticides [5].

Because of the pesticides toxicity and their harmful effects to the environment, especially in water, the development of efficient analytical methods to detect the presence of pesticides in water is

* Corresponding author. Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Campus Universitário de Ondina, 40170-290 Salvador, BA, Brazil.
E-mail address: pedroapp@ufba.br (P.A.P. Pereira).