



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E  
PURIFICAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS  
ORGANOFOSFORADOS EM TOMATE POR CROMATOGRÁFIA.**

**Beatriz Inêz Almeida Kaipper**

**Dissertação de Mestrado**

**Submetida ao curso de Pós-Graduação  
em Química da UFSC para obtenção  
do grau de Mestre em Química**

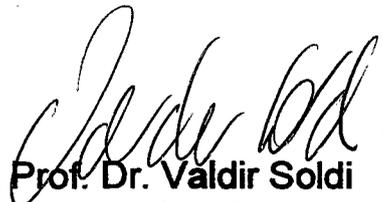
**Florianópolis, outubro de 1998**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E  
PURIFICAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS  
ORGANOFOSFORADOS EM TOMATE POR CROMATOGRÁFIA.**

**Beatriz Inêz Almeida Kaipper**

**Dissertação aprovada em sua forma final para obtenção do grau de Mestre  
no curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa  
Catarina, pelo Orientador e Banca examinadora:**

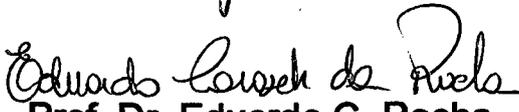
  
**Prof. Dr. Luiz A. S. Madureira**  
**Orientador**

  
**Prof. Dr. Valdir Soldi**  
**Coordenador do Curso**

**Banca examinadora**

  
**Prof. Dr. Henry X. Corseuil**

  
**Prof. Dr. Roldão R.U. Queiroz**

  
**Prof. Dr. Eduardo C. Rocha**

**"A saúde, síntese do equilíbrio ecológico do indivíduo, abrange a totalidade do ser e adquire a categoria e a universalidade de um direito fundamental do homem."**

**Dedico ao Kaipper  
pelo apoio,  
incentivo, e amor  
em todos os dias...**

## **Agradecimentos**

- À minha mãe, que sempre me auxiliou e incentivou em meus projetos.
- Ao Prof. Dr. Madureira pela orientação.
- Ao Prof. Dr. Henry, que em muito auxiliou para realização deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Eduardo Carasek pelas sugestões de enriquecimento do trabalho.
- À Prof. Dra. Graça pelo uso do laboratório.
- Aos professores da Pós-Graduação, especialmente ao Prof. Dr. Roldão.
- Ao pessoal do LIMA e do lab. 216 pelo convívio e amizade.
- À secretaria da Pós-Graduação.
- À CAPES.
- Ao pessoal da Biblioteca setorial do CFM.
- Ao Hermes pelas análises feitas na Embrapa - SP.
- A DEUS por tudo...

## SUMÁRIO

Índice de figuras e esquemas .....	i
Índice de tabelas .....	ii
Abreviações .....	iii
Resumo .....	iv
Abstract .....	v

### CAPÍTULO I

#### INTRODUÇÃO

I.1 Definição e classificação de pesticidas .....	1
I.2 Preparação da amostra e extração dos resíduos de pesticidas .....	2
I.3 Purificação dos extratos e solventes de eluição .....	5
I.4 Determinação de pesticidas organofosforados .....	9
I.5 Caracterização de alguns pesticidas organofosforados .....	9
I.6 Degradação de pesticidas organofosforados .....	15
I.7 Objetivos .....	18
I.8 Justificativa .....	19

### CAPÍTULO II

#### PARTE EXPERIMENTAL

II-1 Material .....	21
II-1.1 Reagentes .....	21
II-1.2 Outros materiais .....	22
II-1.3 Solventes .....	22
II-1.4 Equipamentos .....	22
II-2 Lavagem da vidraria .....	23
II-3 Amostragem .....	23
II-4 Preparo de soluções e conservação .....	23
II-5 Metodologia .....	24
II-5.1 Método Dispersão de Matriz de Fase Sólida .....	24
II-5.1.1 Método Dispersão de Matriz de Fase Sólida utilizando florisil .....	25

II-5.2 Método Extração em Fase Sólida .....	26
II-5.2.1 Purificação e/ou pré-concentração em C18 .....	27
II-5.2.2 Purificação e/ou pré concentração em carvão ativado.....	28
II-5.2.3 Purificação e/ou pré concentração em florisil.....	29
II-6 Determinação da linearidade do método .....	30

### **CAPÍTULO-III**

#### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

III-1 Método Dispersão de Matriz de Fase Sólida .....	32
III-2 Método Extração em Fase Sólida utilizando florisil .....	34
III-3 Método Extração em Fase Sólida utilizando C18 .....	36
III-4 Método Extração em Fase Sólida utilizando carvão ativado.....	39
III-4.1 Linearidade do detector .....	45

### **CAPÍTULO-IV**

<b>CONCLUSÕES</b> .....	48
-------------------------	----

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	51
--------------------------	----

## LISTA DE FIGURAS E ESQUEMAS

Figura 1 - Estruturas fundamentais do POPs.....	10
Figura 2 - Grupos de gerais ésteres dos POPs.....	10
Figura 3 - Produtos de degradação (hidrólise) de alguns POPs .....	16
Figura 4 - Produtos de oxidação dos POPs paration metílico e malation .....	17
Esquema 1 - Localização da região da Bacia do Cubatão-Sul .....	20
Esquema 2 - Procedimento realizado na análise de POPs pelo método DMFS...24	
Esquema 3 - Procedimento realizado na análise de POPs pelo método EFS .....	26
Figura 5 - Cromatograma de recuperação pelo método DMFS utilizando florisil (15g).....	33
Figura 6 - Cromatograma de recuperação pelo método DMFS utilizando florisil (10g).....	33
Figura 7 - Cromatograma de recuperação por EFS utilizando florisil; extração em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> e eluição em acetona .....	34
Figura 8 - Cromatograma de recuperação por EFS utilizando florisil; extração e eluição em acetato de etila.....	35
Figura 9 - Cromatograma de recuperação por EFS utilizando C18; extração em água e eluição em acetona .....	37
Figura 10 - Cromatograma de recuperação por EFS utilizando C18; extração em água e eluição em acetona-metanol .....	38
Figura 11 - Cromatograma de recuperação por EFS utilizando C18; extração em água e eluição em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona (9:1).....	39
Figura 12 - Cromatograma de recuperação por EFS utilizando C. ativado; extração e eluição em acetato de etila (5mL) .....	40

Figura 13 - Cromatograma de recuperação por EFS utilizando C. ativado; extração e eluição em acetato de etila (10mL).....	41
Figura 14 - Cromatograma de recuperação por EFS utilizando C. ativado; extração em acetona e eluição em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona (7:3).....	42
Figura 15 - Cromatograma de recuperação por EFS utilizando C. ativado; extração em acetato de etila e eluição em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acet. de etila (7:3).....	44
Figura 16 - Faixa linear do detector para os POPs estudados.....	46
Figura 17 - Eficiência de extração em relação à concentração.....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frutos e vegetais divididos em seis principais grupos de amostras .....	6
Tabela 2 - Otimização de solventes para extração e purificação em C18.....	27
Tabela 3 - Otimização de solventes utilizados para extração e purificação em carvão ativado .....	29
Tabela 4 - Otimização de solventes utilizados para extração e purificação em florisil .....	30
Tabela 5 - Recuperação de POP pelo método DMFS com florisil.....	32
Tabela 6 - Recuperação de POPs pelo método EFS utilizando o adsorvente C18; extração em água e eluição com acetona .....	36
Tabela 7 - Recuperação de POPs pelo método EFS utilizando o adsorvente carvão Ativado; extração e eluição em acetato de etila. ....	40
Tabela 8 - Recuperação de POPs por EFS utilizando o adsorvente carvão ativado; extração em acetona e eluição em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona (7:3) .....	42
Tabela 9 - Recuperação de POPs por EFS com carvão ativado; extração em acetato de etila e eluição em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetato de etila (7:3).....	43

## **Abreviações**

**POP** - Pesticida Organofosforado

**MMR** - Métodos Multi-residuais

**CG** - Cromatografia Gasosa

**CLAE** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**EFS** - Extração em Fase Sólida

**PFS** - Purificação em Fase Sólida

**DMFS** - Dispersão de Matriz de Fase Sólida

**ELL** - Extração Líquido-Líquido

**NRM** - Nível de Resíduo Máximo

**DNF** - Detector de Nitrogênio e Fósforo

**C18** - Octadecilsiloxano, sílica fase-ligada reversa

**p.f.** - Ponto de fusão

**p.e.** - Ponto de ebulição

**p.v.** - Pressão de vapor

**S** - Solubilidade em água

**CV** - Coeficiente de variação

**LD** - Limite de Detecção

**U.S EPA** - Agência de Proteção ao Meio Ambiente dos EUA

## RESUMO

No presente trabalho foram desenvolvidos métodos de extração e purificação a fim de determinar e monitorar o conteúdo de pesticidas organofosforados, tais como o metamidofós, acefato, malation e paration metílico, mais utilizados em tomate na grande Florianópolis. Foram utilizadas as técnicas de EFS e DMFS para o estudo de recuperação dos pesticidas, onde as mesmas foram otimizadas no intuito de uma melhor extração e recuperação dos analitos, bem como eliminação de possíveis interferentes da matriz. As amostras foram fortificadas com soluções padrão dos pesticidas em 0,1-0,4  $\mu\text{g g}^{-1}$  para o método DMFS e em 0,2-0,6  $\mu\text{g g}^{-1}$  para o método EFS, de acordo com o NRM. Para o método EFS a extração dos POPs foi realizada em ultra-som e posteriormente fez-se a purificação do extrato em mini-colunas de adsorção de florisil, carvão ativado e C18. Vários solventes foram testados para extração dos pesticidas do tomate e eluição dos adsorventes. Excelentes resultados foram conseguidos com EFS em carvão ativado, com extração dos POPs do tomate com acetato de etila e eluição do adsorvente com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -acetato de etila (7:3), obtendo-se uma recuperação de  $99,01 \pm 4,18$  (%) para o metamidofós,  $97,18 \pm 1,32$  (%) para o acefato,  $85,00 \pm 6,28$  (%) para o paration metílico e  $100,00 \pm 0,75$  (%) para o malation. O limite de detecção foi calculado para os analitos, apresentando valores de 0,04  $\text{ng g}^{-1}$  para o metamidofós, 0,12  $\text{ng g}^{-1}$  para o acefato, 0,10  $\text{ng g}^{-1}$  para o paration metílico e 0,07  $\text{ng g}^{-1}$  para o malation. Os métodos utilizados para análise de POPs foram simples e rápidos. Adicionalmente, o adsorvente carvão ativado mostrou ser eficiente para purificação da matriz de tomate e para uma recuperação quantitativa dos analitos, especialmente os mais polares.

### **Abstract**

In the present work were developed extraction and purification methods with the purpose of determining and monitoring the content of the most utilized organophosphate pesticides during the tomato crop at Florianópolis city agricultural district. SPE and MSPD technics were utilised with the aim of studying the recovery of the following pesticides: methamidophos, acephate, malation and methyl parathion. In this study those technics were improved for a more efficient extraction and recovery of analytes, as well as for favouring the elimination of some possible matrix interferences. The samples were fortified with the pesticide standard solution at 0,1 - 0,4  $\mu\text{g g}^{-1}$  for the MSPD method and at 0,2 - 0,6  $\mu\text{g g}^{-1}$  for the SPE method, according to Maximum Residue Level. For the SPE method, organophosphate pesticide was carried out in an ultrasound equipment and the extract purification performed furtherly in mini columns with florisil, activated charcoal or C18. Several solvents were investigated for the pesticide extration and elution. Outstanding results were achieved with SPE in activated charcoal, using either ethyl acetate for extraction and also with dichloro-methane - ethil acetate (7:3) elution, obtaining for recoveries of  $99,01 \pm 4,18$  (%) for methamidophos,  $97,18 \pm 1,32$  (%) for acephate,  $85,00 \pm 6,28$  (%) for methyl parathion and  $100,00 \pm 0,75$  for malathion. The limits of detection of the anaytical method were estimated as  $0,04 \text{ ng g}^{-1}$  for methamidophos,  $0,12 \text{ ng g}^{-1}$  for acephate,  $0,10 \text{ ng g}^{-1}$  for methyl parathion and  $0,07 \text{ ng g}^{-1}$  for malathion. The methods employed here for organophosphate pesticide analyses were simple and fast. Additionally, activated charcoal demonstrated efficient for tomato matrix purification as well as for a quantitative recovery of the analytes, especially the most polars.

## **CAPÍTULO-I**

### **INTRODUÇÃO**

#### **I.1 - Definição e classificação de pesticidas**

A Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) do Ministério da Saúde definiu pesticida como substância ou mistura de substâncias destinadas a prevenir a ação, ou destruir direta ou indiretamente insetos, ácaros, roedores, fungos, nematóides, ervas daninhas, bactérias, e outras formas de vida animal ou vegetal prejudiciais à lavoura, à pecuária, a seus produtos e outras matérias-primas. Pesticida, portanto, é um termo geral que cobre uma larga variedade de substâncias como inseticidas, fungicidas, herbicidas, raticidas, nematocidas, moluscidas e acaricidas.<sup>1</sup> Comumente os termos pesticidas e inseticidas são confundidos, porém cada grupo de compostos inclui diferentes classes químicas, tipo de ação e uma diversidade de uso.<sup>2</sup>

Os inseticidas são classificados em quatro grupos químicos a saber: organoclorados, carbamatos, piretróides e os organofosforados. Os inseticidas organofosforados são classificados em sistêmicos e não-sistêmicos quanto à sua aplicação nas plantas.

Os inseticidas ou pesticidas organofosforados sistêmicos, quando aplicados nas folhas, ramos e raízes das plantas, são rapidamente absorvidos e translocados com a seiva para as várias regiões da planta. Os sistêmicos possuem as vantagens, logo que são absorvidos pela planta, de causarem menor desequilíbrio biológico, possuírem maior período de ação (pouca exposição ao tempo, já que é incorporado pela planta) e apresentarem menor possibilidade de gerar pragas resistentes, devido sua relativa seletividade. Entretanto os sistêmicos caracterizam-se por uma maior toxicidade e as plantas necessitarem um maior tempo de carência para o emprego na alimentação.

Por outro lado, os não-sistêmicos são menos tóxicos e têm menor tempo de carência para o emprego na alimentação, porém ainda perturbam o equilíbrio biológico.<sup>3</sup>

## **I.2 - Preparação da amostra e extração dos resíduos de pesticidas.**

Os métodos para análise de resíduos de pesticidas em frutos e vegetais geralmente consistem da extração dos analitos da matriz da amostra, purificação para remoção dos interferentes co-extrativos e/ou pré-concentração dos analitos e finalmente a análise instrumental. Cada procedimento analítico é selecionado de acordo com a estrutura química dos pesticidas e o caráter da matriz.<sup>4</sup>

No primeiro estágio, para extração dos resíduos de pesticidas da amostra de frutos e vegetais, primeiramente é feita uma desintegração total da matriz em alta velocidade por um processador mecânico para homogeneização da amostra na presença de um solvente ou mistura de solventes.<sup>5</sup>

Há dois tipos de métodos para manipulação do extrato da amostra. Um consiste em remover completamente os analitos da matriz da amostra extraíndo as amostras mais de uma vez (Extração Líquido-Líquido - ELL) e lavar o remanescente com uma larga quantidade de solvente (superior a 100 mL).

O outro consiste em extrair a amostra uma vez e tomar uma alíquota do extrato para subsequente purificação. Em ambos procedimentos, o extrato é separado da matriz da amostra por filtração (para remoção das fibras), centrifugação ou simplesmente deixando a amostra em repouso por aproximadamente 10 minutos. Em seguida faz-se o subsequente passo de purificação.<sup>5</sup> A validade desta prática pode ser verificada por testes de recuperação em amostra fortificadas com padrões.

O método da AOAC (Association of Official Analytical Chemists) é reconhecido internacionalmente como um MMR que permite a determinação de inseticidas organofosforados, organoclorados, carbamatos e outros pesticidas em amostras de alimentos lipofílicos ou não, com alto e baixo conteúdo de açúcar.

De acordo com esse método, as análises de resíduos de POPs em frutos e vegetais freqüentemente envolvem extração com acetona. Com o solvente extrator, os POPs são separados do extrato de acetona aquoso pela partição líquido-líquido, seguida pelo estágio de purificação.

A extração tipicamente emprega diluição do extrato de acetona aquoso com uma solução de um eletrólito (NaCl ou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e sucessivas extrações em funil de separação com diclorometano. Sobre essas condições vários POPs são recuperados.<sup>7,8</sup>

Esses procedimentos, contudo, levam a prejuízos, como a quantidade de reagentes e solventes requeridos, lavagem e preparação da vidraria, e a ocorrência de trabalhosas emulsões no estágio de extração na fase aquosa com acetona-diclorometano.<sup>9,10</sup>

Adicionalmente, esses métodos são complexos, não permitindo gerar dados relevantes em tempo suficiente para analisar alimentos de um supermercado. A quantidade de solventes tóxicos usados é usualmente um fator de  $10^8$  a  $10^{10}$  maior do que os resíduos de pesticidas a serem determinados. Ainda, as novas classes de pesticidas desenvolvidas são cada vez mais polares e/ou termodegradáveis e deveriam ser incorporados em métodos multi-residuais.<sup>2,11</sup>

Recentemente, ocorreu uma significativa evolução nas análises de resíduos de pesticidas em frutos e vegetais, onde se procura simplificação, minimização e melhoramento da extração e purificação da amostra. Técnicas como Extração por Fase Sólida e Micro-extração em Fase Sólida em substituição à Extração Líquido-Líquido, Dispersão de Matriz de Fase Sólida e Extração com Fluido Super-crítico têm sido propostas.

Simplificação de procedimentos analíticos tem sido alcançada também pela combinação de operações (extração e purificação) em um único passo. No método DMFS, a amostra de frutos e vegetais é misturada com o adsorvente (florisil, sílica gel, C<sub>18</sub>), resultando uma amostra pulverulenta, a qual é transferida para uma coluna sobre uma camada de 5mm de sulfato de sódio anidro. A eluição de resíduos através da coluna de DMFS com um solvente apropriado normalmente resulta em extratos limpos, que se necessário, podem ser posteriormente purificados. DMFS é uma técnica nova de extração e/ou purificação que tem sido desenvolvida para evitar os gastos tradicionais da ELL( uso de grande quantidade de solventes), e a ocorrência de trabalhosas emulsões com certas matrizes de frutos e vegetais.<sup>2,4,6,9,10,19,20</sup>

Micro-extração em Fase Sólida é uma técnica recente que utiliza uma única etapa para extração, purificação e enriquecimento dos analitos, igualmente simples e rápida, na qual uma fibra de sílica coberta de uma fina camada de fase estacionária é utilizada para extrair os analitos de uma amostra aquosa ou gasosa. Após a extração a fibra é diretamente transferida para o injetor do Cromatógrafo

Gasoso, por meio de uma seringa modificada, onde os analitos são dessorvidos termicamente e analisados.<sup>6</sup>

Em relação ao solvente extrator, é importante obterem-se condições apropriadas para a transferência de resíduos da amostra para o mesmo, onde o tipo de solvente e o passo de homogeneização (no processador mecânico) utilizados podem influenciar a eficiência de extração.<sup>5</sup>

O solvente extrator, em MMR de frutos e vegetais, precisa ser adequado para a extração de compostos, com uma larga faixa de polaridade, de várias matrizes contendo diferentes quantidades de água, açúcar e outras substâncias. Nesses MMR, os solventes mais utilizados são: a acetona e a acetonitrila. Ambos são miscíveis em água, onde a extração é realizada pela mistura desses solventes com a água contida na amostra.<sup>4,5</sup>

O mérito da acetonitrila é que muitos co-extrativos lipofílicos de plantas não são extraídos, devido sua alta polaridade, resultando em cromatogramas com menos interferentes. Outra significativa vantagem da acetonitrila sobre outros solventes na análise de resíduos de pesticidas é possuir uma forte habilidade de solvatação, aumentando a eficiência de extração. Adicionalmente, os resíduos de pesticidas podem ser separados da acetonitrila aquosa por um simples processo "salting-out".<sup>5,12</sup>

No entanto, a acetonitrila possui desvantagens como dificuldade na sua remoção, quando necessário antes da determinação, alto custo e toxicidade.<sup>4,5</sup> Neste contexto, tendo em vista a procura crescente para minimização da toxicidade de solventes orgânicos, a acetonitrila tem sido substituída por acetona.<sup>2</sup>

Extração com acetona tem sido preferida visto ser adequada para POPs polares e apolares, como foi demonstrado em diferentes estudos comparativos realizados por CG e CLAE. Acetona possui baixa toxicidade, é fácil de purificar, evaporar, filtrar, e é de baixo custo. Adicionalmente, pode ser usada com matrizes de alto conteúdo de açúcar, pois não forma um sistema de duas fases com água na presença de açúcar. Ambrus et. al.<sup>21</sup> recomendam acetona para a extração de resíduos de pesticidas dos grupos I a III de amostras (Tabela-1), incluindo o tomate. Contudo, seus extratos contêm mais co-extrativos de plantas que precisam ser removidos no passo de purificação.<sup>4,5</sup>

Acetato de etila, juntamente com Na<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> como agente secante, tem sido muito empregado na extração de amostras, em substituição à ELL, mostrando ser um solvente eficiente na análise de POPs de várias polaridades e diferentes matrizes de frutos e vegetais.<sup>13,14,15,16,17</sup>

Com a minimização da escala da amostra no passo de extração, tem-se conseguido diminuir consideravelmente o consumo de solventes. Em muitos métodos publicados, o peso da amostra tem sido de poucos gramas (5 a 10g), com um volume de solvente para extração de no máximo de 100mL. A escala mínima usada depende de alguns fatores como as propriedades da matriz, o passo de homogeneização e a sensibilidade na detecção instrumental.<sup>6</sup>

### **I.3 - Purificação dos extratos e solventes de eluição**

Purificação por Fase Sólida, com procedimentos em mini-colunas prontas para uso, tem sido muito utilizada. Para esse estágio de purificação, técnicas como Co-distilação a Vapor, Cromatografia por Exclusão e Permeação em Gel também são utilizadas.<sup>2,4,6,10</sup>

Minimização da escala de purificação tem sido proporcionada pelo uso de minicolunas disponíveis para purificação, onde somente uma pequena alíquota do extrato é purificado e usado para análise. Essa minimização da escala da amostra não somente reduz o consumo de solventes, como também reduz em muito o tempo de análise.<sup>6</sup>

EFS é uma simples técnica de preparação baseada na separação por adsorção. A separação é realizada pela distribuição do soluto entre a fase normal (líquida) e a fase estacionária (sólida), onde a solubilidade e interações de grupos funcionais da amostra, solvente e adsorvente são consideradas para resultar na retenção e eluição dos analitos.

Analitos mais polares são extraídos de soluções menos polares em adsorventes polares. Soluções menos polares são necessárias, pois a polaridade do solvente da amostra influencia na adsorção do analito, visto que um solvente mais polar competiria com o analito pelos sítios de adsorção. Adsorventes para fase normal são modificados com grupos ciano, diol e amino.

Analitos menos polares são extraídos de soluções mais polares em adsorventes apolares. Similarmente às soluções menos polares, soluções polares

também competem com o analito pelos sítios de adsorção. Adsorventes para fase-resersa são modificados com grupos octadecil, octil, ciclohexil ou grupos fenóis.<sup>4</sup>

EFS tem sido largamente utilizada para pré-concentração de traços de pesticidas, principalmente para matrizes com alto conteúdo de água. De acordo com a comissão do Codex Alimentarius a classificação das amostras de frutos e vegetais é baseada nos tipos botânicos.<sup>8</sup> Para propósitos analíticos, Ambrus et. al.<sup>21</sup> têm dividido as amostras em 6 grupos principais (Tabela 1), segundo suas composições químicas.

Tabela 1 - Frutos e vegetais divididos em seis principais grupos de amostras.<sup>21</sup>

Grupo	Amostras de frutos e vegetais
I	Amostras de alto conteúdo de água (raiz e bulbo de vegetais, como cenoura, cebola, alho, raiz de salsa).
II	Frutas e vegetais de baixo conteúdo de clorofila e gordura, grande quantidade de água (banana, frutas cítricas, caroços de frutas, grãos, rabanete, beterraba e vegetais frutíferos, como o tomate).
III	Plantas de alto conteúdo de clorofila, porém com baixo conteúdo de gordura (folhas de plantas, tabaco, legumes de folhas largas).
IV	Frutas com baixo conteúdo de água e alto conteúdo de açúcar (figos, tâmaras, uva e ameixas secas).
V	Amostras secas de baixo conteúdo de gordura (cereais em grãos, trigo, milho, chás secos, alimento para gado).
VI	Amostras de alto conteúdo de gordura (sementes gordurosas, amendoim, nozes, pimenta vermelha, soja, cacau, café).

Diferentes tipos de frutos e vegetais e textura da amostra necessitam de diferentes procedimentos para purificação do extrato concentrado. Ambrus e Thier<sup>5</sup> classificaram amostras para extração em três grupos; amostras de alto e médio conteúdo de água, como o tomate; amostras não-hidrofílicas e amostras lipofílicas.

Análises de POPs em alimentos é um considerável problema devido à complexidade freqüente das matrizes. Partículas sólidas, constituintes solúveis da matriz, como exemplo, os pigmentos, precisam ser removidos do extrato, já que podem levar ao detrimento das colunas capilares durante a determinação no Cromatógrafo Gasoso.

Muitos MMR incluem o passo de purificação de frutos e vegetais usando colunas de adsorção de florissil, alumina e sílica gel. Em geral essas colunas de adsorção providenciam boa purificação quando são eluídas com misturas de solvente de baixa polaridade, eluindo resíduos menos polares e retendo co-extrativos mais polares na coluna.<sup>4,5,10</sup>

Florissil tem sido muito utilizada para purificação de frutos e vegetais em análises de POPs. Substâncias polares como clorofilas, triglicérides e fitoesteróis, comuns em frutas e vegetais, são adsorvidas à superfície da florissil, embora seja particularmente apropriada para purificação de amostras lipofílicas (25g de florissil com 3% de água retém 1g de gordura).<sup>2,4,5</sup>

Viana et. al.<sup>18</sup> mostraram que o perfil cromatográfico de tomate com florissil apresenta uma melhor purificação, com uma melhor linha de base, se comparado aos cromatogramas de sílica gel e alumina. A recuperação utilizando alumina e sílica gel é similar à florissil, entretanto geralmente seus extratos contêm mais substâncias endógenas.

Florissil pode ser substituída por alumina em matrizes lipofílicas, onde alumina retém os co-extrativos de plantas, porém, por outro lado, a alumina básica pode decompor alguns POPs (reações de condensação, polimerização ou desidratação), e alguns POPs mais polares não são eluídos de alumina neutra ou ácida.

A sílica gel, em geral, é menos eficiente do que alumina e não separa alguns pesticidas mais polares de co-extrativos de plantas, embora esteja sendo utilizada, após desativação com 10-30% de água, por muitos autores.<sup>4,5</sup> Loes et.

al.<sup>22</sup> propõem um condicionamento da coluna de sílica gel com ácido acético 1% em hexano, conseguindo-se uma melhora significativa na recuperação de alguns POPs. Esse procedimento sugere um aumento na estabilidade dos POPs em meio ácido ou uma desativação dos sítios de adsorção da sílica gel pelo ácido, impedindo os POPs de se ligarem ao adsorvente.

Quando uma coluna de florisil é eluída com solventes de baixa polaridade, resíduos relativamente apolares são recuperados sempre quantitativamente. Uma desvantagem, contudo, é que a florisil possui uma alta atividade e essa pode variar de uma extração para a outra.<sup>4,5</sup> Em vista disso, adsorventes de carvão ativado-celulose(2:8) têm sido propostos para purificação de extratos, em substituição a florisil, na determinação de POPs.<sup>23,24,25</sup>

Com relação aos solventes de eluição, pode-se dizer que a força desses solventes dependerá da natureza do adsorvente, das características químicas dos analitos e dos interferentes da matriz. Em muitos MMR para análise de POPs em frutos e vegetais, quanto maior a polaridade do solvente, mais substâncias interferentes são eluídas e menos efetiva será a purificação.<sup>4,5,9</sup>

Purificação com éter de petróleo é excelente para análises de pesticidas apolares, no entanto co-extrativos lipofílicos (gordura, cera vegetal, carotenóides) são eluídos com o mesmo. Diclorometano é menos eficiente na purificação, mas é necessário para recuperação de pesticidas relativamente mais polares que não são solúveis em éter de petróleo.<sup>5,26</sup>

Comparação da recuperação de pesticidas mostram que vários solventes menos tóxicos como ciclohexano, éter de petróleo, éter metil tert-butilico e acetato de etila são apropriados para substituir solventes extremamente tóxicos e persistentes como o diclorometano.<sup>2</sup> No passado, substituições já foram realizadas, como benzeno por tolueno e triclorometano por diclorometano. Koinecke<sup>13</sup> relata que uma emissão substancial de compostos clorados para as águas residuais de institutos químicos, é causada pelo uso do evaporador rotatório, durante a concentração de pesticidas, onde a substituição de solventes clorados melhoraria a qualidade da água.

Acetato de etila tem sido muito utilizado para a eluição dos POPs, onde se tem observado alta recuperação de compostos de diferentes polaridades, sem

larga quantidade de interferentes. Acetato de etila possui vantagens como baixa toxicidade, facilidade na evaporação e filtração.<sup>5,14,15,17-20,25,27</sup>

#### **1.4 - Determinação de pesticidas organofosforados**

O método para determinação de pesticidas deve ser realizado por estudos de recuperação, onde se contamina com soluções padrão de concentrações conhecidas, uma amostra que não sofreu qualquer tipo de contato com o pesticida. Faz-se todo o procedimento normal de análise e depois quantifica-se os respectivos padrões. Desta forma, testa-se a eficiência do método, incluindo os solventes e adsorventes empregados no mesmo.

Métodos cromatográficos são os mais largamente utilizados para separação, identificação e quantificação analítica de resíduos de POPs em diferentes matrizes, onde a aplicação de sistemas de detecção seletivos e altamente sensíveis torna-se essencial nas análises, como o DNF. A sensibilidade desse detector é usualmente melhor para compostos contendo fósforo que nitrogênio.<sup>2,4,18</sup>

Um detector seletivo ideal para análise de resíduos de pesticidas deverá responder aos analitos e não responder a co-extrativos. Desta forma, em uma determinação, detectores seletivos podem minimizar os interferentes. Entretanto, injeções repetidas de amostras com alto conteúdo de co-extrativos levam ao detrimento de colunas capilares, sendo primordial a purificação dos extratos.<sup>2,6</sup>

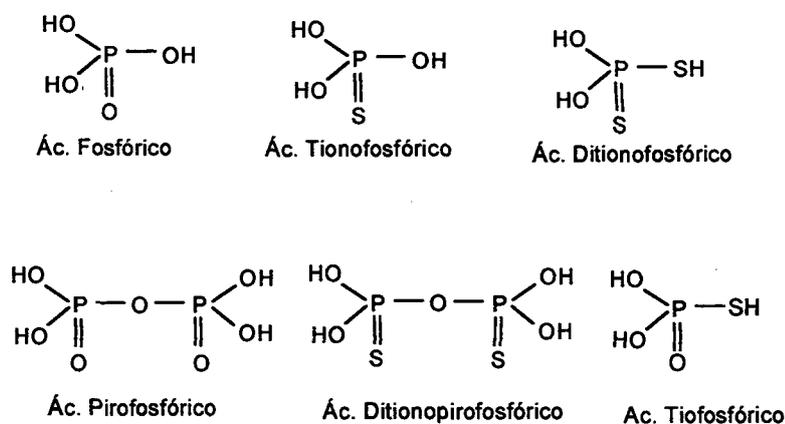
Em adição, vale ressaltar que mesmo com a purificação dos extratos, em matrizes de alimentos, faz-se necessário uma manutenção contínua do aparelho, já que um vasto número de co-extrativos podem se depositar no injetor e na coluna capilar, podendo reduzir a sensibilidade do Cromatógrafo Gasoso progressivamente para alguns compostos.<sup>24,28</sup>

Em análises MMR de POPs, Cromatografia Gasosa acompanhada à Espectrometria de Massas é utilizada para confirmação secundária de resultados obtidos por CG-DNF, bem como confirmação da presença de metabólitos.<sup>16,27,29,30,31</sup>

#### **1.5 - Caracterização de alguns pesticidas organofosforados**

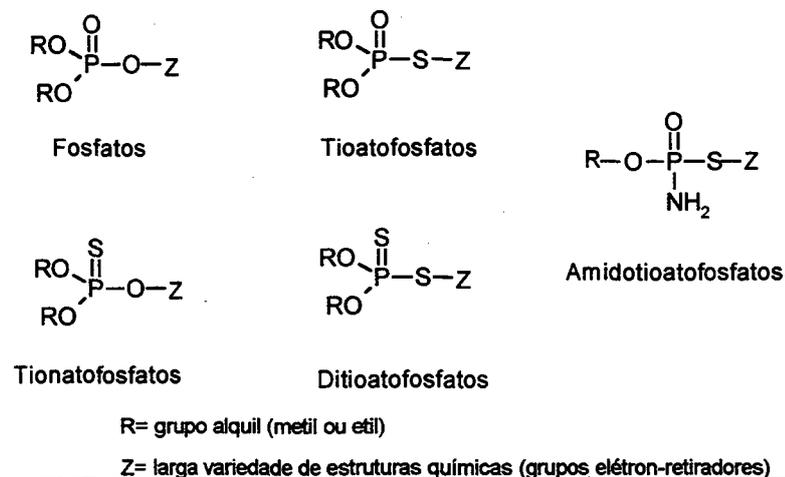
Os organofosforados são largamente aplicados como inseticidas pela sua alta atividade biológica, que é devida à variedade de substituintes que podem se

ligar ao átomo central de fósforo.<sup>32,33</sup> Os pesticidas organofosforados (POPs) são derivados das estruturas fundamentais, ilustradas na Figura 1.



**Figura 1 - Estruturas fundamentais dos POPs**

De acordo com suas estruturas químicas, os POPs se dividem em 5 grupos gerais de ésteres, ilustrados na Figura-2.<sup>33,34</sup>



**Figura 2 - Grupos gerais de ésteres dos POPs**

A seguir é feita uma caracterização dos POPs estudados no presente trabalho, suas respectivas estruturas e propriedades físico-químicas.<sup>35,36,37,38</sup>

## MALATION

---

### 1-Princípio ativo: MALATION

### 2-Identificação do composto

2.1-Nome comum: malation

2.2-Nome comercial: Cythion, Enmatos, Fyfanom, malatol, Carbofos

2.3-classe: Inseticida e acaricida; classe toxicológica III\*

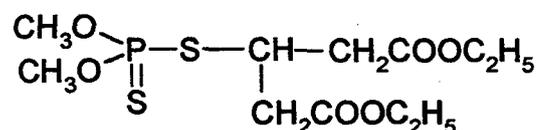
2.4-Grupo: Ditioniofosfórico, não sistêmico

2.5-Nome Químico: dietil (dimetoxitiofosforietio) succinato, (IUPAC);  
dietil (dimetoxifosfinotioil) tiobutanodioato(CA)

2.6-Tolerância e Intervalo de segurança (tomate):  $3,0\mu\text{g g}^{-1}$ ; 3 dias

### 3-Características físico-químicas:

#### 3.1-Fórmula estrutural:



3.2-Fórmula Condensada:  $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{PS}_2$

3.3-Massa Molecular: 330,3

3.4 Estabilidade: Instável à radiação ultra-violeta, estando sujeito a

fotodegradação; Meia vida de hidrólise tem sido reportada em vários pHs e temperatura de 20-27°C: 1 a 21 semanas em pH 6,0; 1 a 7 semanas em pH 7,0; 1,6 semanas em pH 7,4; 0,2 a 1 semana em pH 8,0. Contudo não tem sido observado hidrólise em pH ácido. Produtos de hidrólise e oxidação incluem malaaxon, malation  $\alpha$  e  $\beta$  monoácido, ácido o,o-dimetilfosforoditióico; dietil fumarato; ácido o,o-dimetilfosforotíonico.

3.5-Propriedades: Malation 95% puro é um líquido âmbar claro; p.f. 2,85°C; p.e. 156-157 °C /0,7 mmHg; p. v.  $20 \times 10^{-6}$  mmHg; d. 1,220g/cm<sup>3</sup> a 20°C; S: 145mg/L; miscível na maioria dos solventes orgânicos.

## PARATION METÍLICO

---

### 1-Princípio ativo: PARATION METÍLICO

### 2-Identificação do composto

2.1-Nome comum: paration metílico

2.2-Nome comercial: Folidol, Metacide, Bladan

2.3-Classe: inseticida e acaricida, classe toxicológica I.\*

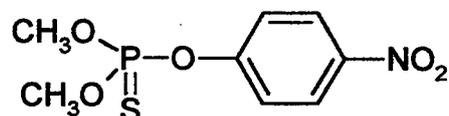
2.4-Grupo: tionatofosfórico não sistêmico

2.5-Nome químico: o,o-dimetil o,4-nitrofenil fosfotionato (IUPAC)); o,o-dimetil o-(4-nitrofenil) fosforotionato(CA)

2.6-Tolerância e Intervalo de segurança (tomate):0,5µg g<sup>-1</sup>, 15 dias

### 3-Características físico-químicas:

#### 3.1-Fórmula estrutural:



3.2-Fórmula Condensada: C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>5</sub>PS

3.3-Massa Molecular: 363,2

3.4 Estabilidade: Fotodegradação tem sido observada em oito dias no verão e 38 dias no inverno; hidrólise é baixa (3 a 6 meses) em pH neutro, mas é rápida em pH básico. Meia vida de hidrólise são 145, 136 e 15,7 dias em pH 5, 7, e 8,5, respectivamente. Produtos identificados inclui p-nitrofenol; ácido O-metil-O'-p-nitrofeniltiofosfórico e paraoxon metílico.

3.5-Propriedades: Paration metílico 80% puro é um líquido amarelo; p.f 35-36<sup>o</sup>C; p.e. não disponível; p. v. 8.5 x 10<sup>-6</sup>mmHg; d. 1,358g/cm<sup>3</sup> a 20<sup>o</sup>C. S: 55-60mg/L; solúvel na maioria dos orgânicos, com uma solubilidade maior que 1kg/L em diclorometano.

## METAMIDOFÓS

---

### 1-Princípio ativo: METAMIDOFÓS

### 2-Identificação do composto

2.1-Nome comum: metamidofós

2.2-Nome comercial: Tamaron

2.3-classe: Inseticida e acaricida, classe toxicológica I.\*

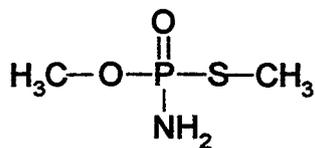
2.4-Grupo: amidotioatofosfórico sistêmico

2.5-Nome Químico: o,s-dimetil fosforamidotioato (IUPAC); o,s-dimetil fosforamidotioato(CA)

2.6-Tolerância e Intervalo de segurança (tomate): 0,3µg g<sup>-1</sup>; 21 dias

### 3-Características físico-químicas:

#### 3.1-Fórmula estrutural:



3.2-Fórmula Condensada: C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>PS

3.3-Massa Molecular: 141,1

3.4 Estabilidade: relativamente estável a temperatura ambiente, mas 50% é decomposto a pH 2,0 e 40<sup>o</sup> C em 140 horas, em pH 9,0 a 37<sup>o</sup> C em 120 horas;

3.5-Propriedades: Metamidofós puro é um sólido; p.f 44,5<sup>o</sup>C; p.e. não disponível; p. v. 800 x 10<sup>-6</sup>mmHg; d. 1,31g/cm<sup>3</sup> a 20<sup>o</sup>C.  
S: 2 x 10<sup>6</sup> mg/L; clorofórmio, diclorometano 100g/L; éter dietílico: 20-25 g/L.

## ACEFATO

---

1-Princípio ativo: ACEFATO

2-Identificação do composto

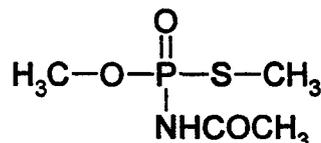
2.1-Nome comum: acefato

2.2-Nome comercial: Orthene

2.3-classe: Inseticida e acaricida, classe toxicológica III.\*

2.4-Grupo: amidotioatofosfórico sistêmico

2.5-Nome Químico: o,s-dimetil acetilfosforamidotioato (IUPAC); N-[metoxi (metiltio) fosfinoil ] acetamida (CA).



2.6-Tolerância e Intervalo de segurança (tomate): 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ ; 7 dias

3-Características físico-químicas:

3.1-Fórmula estrutural:

3.2-Fórmula Condensada: C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>3</sub>PS

3.3-Massa Molecular: 183,2

3.4 Estabilidade: Acefato sofre hidrólise, transformando-se no metamidofós

Mostrou-se resistente a hidrólise, sob condições laboratoriais, em pH de 4,0 a 6,9 a temperaturas de 20°C e 30°C. Já em pH alto acefato é susceptível a hidrólise, onde há uma grande influencia da temperatura. Em pH 8,2, 22% se hidrolisou a 20°C, e 82% a 30°C.

3.5-Propriedades: Acefato 80-90% puro é um sólido incolor; p.f 82-89°C; p.e. não disponível; p. v. 1,7 x 10<sup>-6</sup>mmHg; d. 1,35g/cm<sup>3</sup> a 20°C.

S: 6,5 x 10<sup>5</sup>mg/L; solubilidade em acetona, etanol: maior que 100g/L; em solventes aromáticos menor que 50g/L

---

\*classe toxicológica I- produto altamente tóxico

II- toxicidade média

III- pouco tóxico

## 1.6 - Degradação de pesticidas organofosforados

Os pesticidas organofosforados são muito menos persistentes que os organoclorados, transformando-se rapidamente em seus metabólitos. Embora não seja objetivo deste trabalho estudar a presença de metabólitos, vale relatar a existência deste problema na análise de POPs.

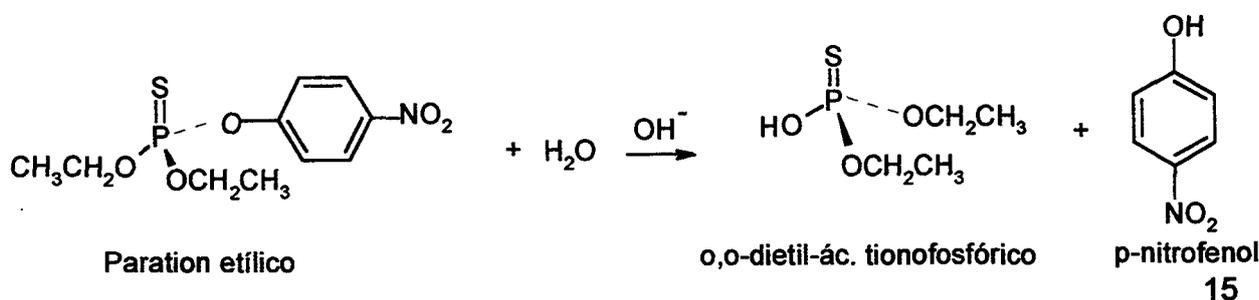
Estudos de decaimento de alguns pesticidas em frutos foi realizado por Perez et. al<sup>39</sup>. O fruto é pulverizado com uma solução do pesticida, onde o mesmo penetra no fruto e é exposto a uma interação com agentes biológicos. Envolvendo, desta forma, dois processos, penetração e degradação. Considerando o fato que os estudos foram realizados em condições laboratoriais, o decaimento dos pesticidas apresentou-se alto dentro do fruto.

No sistema ambiental as variáveis são maiores, onde se tem ainda as degradações fotoquímica e química. Adicionalmente, condições ambientais como pH, temperatura, umidade, luz, chuva, concentração e propriedades específicas dos pesticidas afetarão a razão e modo de degradação.<sup>40</sup>

Embora haja pouca disponibilidade de dados na literatura sobre a reatividade desses compostos em determinadas matrizes e condições, principalmente saber qual processo de transformação que realmente ocorre, é possível demonstrar a decomposição hidrolítica desses compostos, a qual é a mais freqüente.<sup>41</sup>

Os ésteres organofosforados são hidrolisados por reações de substituição nucleofílica, onde o ataque do nucleófilo pode ocorrer no átomo de fósforo ou carbono, dependendo do pH do meio.

Os POPs são muito mais instáveis sob condições alcalinas, onde geralmente uma hidrólise catalisada por base ocorre no átomo de fósforo favorecendo a clivagem na ligação fósforo-oxigênio, conforme ilustrado pela reação do paration etílico, levando ao metabólito p-nitrofenol:<sup>32,41</sup>



Howard<sup>38</sup> relata que o paration etílico é rapidamente metabolizado em plantas e animais. Reação similar de hidrólise ocorre com o análogo paration metílico e com o malation, cujas reações são apresentadas na Figura-3.<sup>32,38,41</sup>

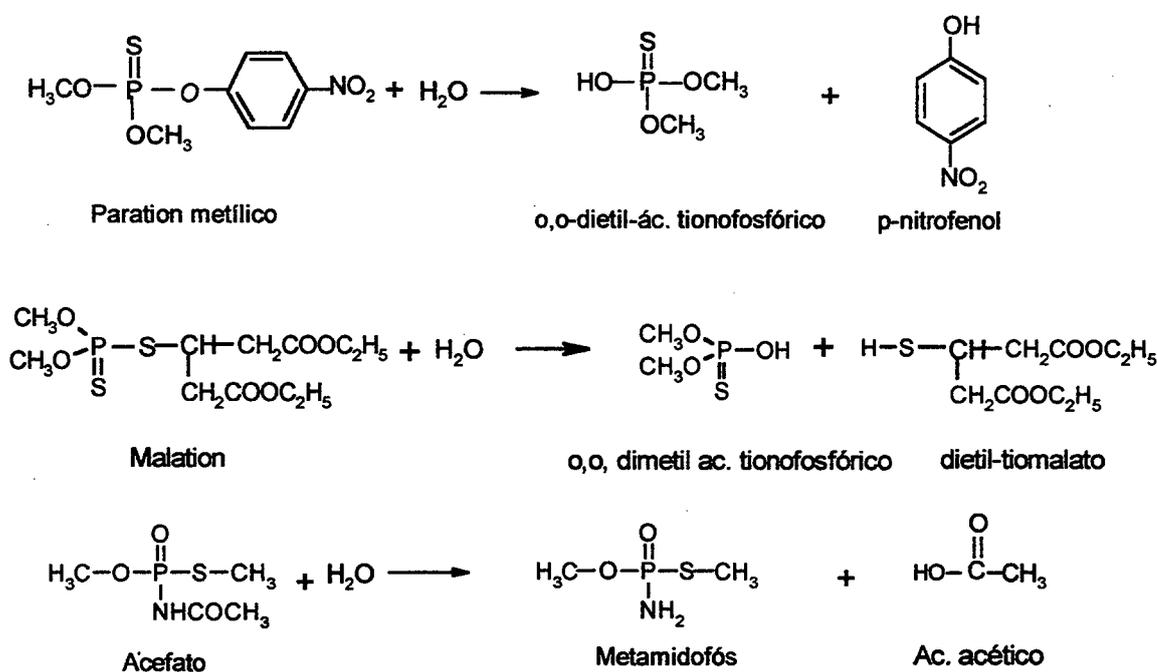
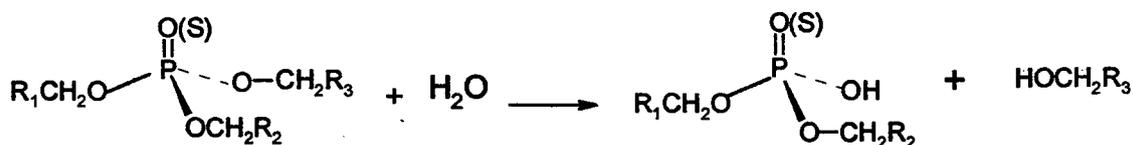


Figura 3 - Produtos de degradação (hidrólise) de alguns POPs

Em meio básico, o ataque do nucleófilo  $\text{OH}^-$  no átomo de fósforo dependerá da deficiência de elétrons do mesmo. Desta forma, a razão de hidrólise dos pesticidas é aumentada pela presença de grupos eletronegativos ligados ao átomo de fósforo. A razão de hidrólise será influenciada também pela temperatura, onde observa-se um aumento de 3,75 vezes a cada aumento de  $10^0\text{C}$ .<sup>40,41</sup>

Uma reação neutra pode ser precedida pela substituição nucleofílica no átomo carbono, como ocorre com os grupos trialquil, trimetil e trietil fosfato.<sup>41</sup>



Reações de hidrólise de amidas são também observadas para o acefato. A hidrólise do acefato leva a uma desacetilação, a qual tem sido observada em algumas plantas e animais, produzindo o metabólito metamidofós (Figura-3), inseticida cerca de 40-50 vezes mais tóxico que o composto original, apesar de possuírem propriedades semelhantes.<sup>23,24,25</sup>

Transformações dos POPs no ambiente inclui também reações de oxidação, especialmente quando consideram-se processos biológicos e fotoquímicos de transformação. Paration e malation têm demonstrado sofrerem fotólise, produzindo compostos similares de elevada toxicidade como o paraoxon e malaoxon, respectivamente (Figura-4). Estes compostos possuem maior toxicidade devido à ligação P=O que condiciona uma maior inibição da acetilcolinesterase.<sup>32,33,38,40,41</sup>

Comparação da reatividade relativa do paration e paraoxon, malation e malaoxon mostra que os ésteres de ácidos tiosfóricos exibem maior resistência à hidrólise neutra ou básica, já que o enxofre é menos eletronegativo do que o oxigênio, reduzindo a eletrofilicidade do átomo central de fósforo.<sup>40,41</sup>

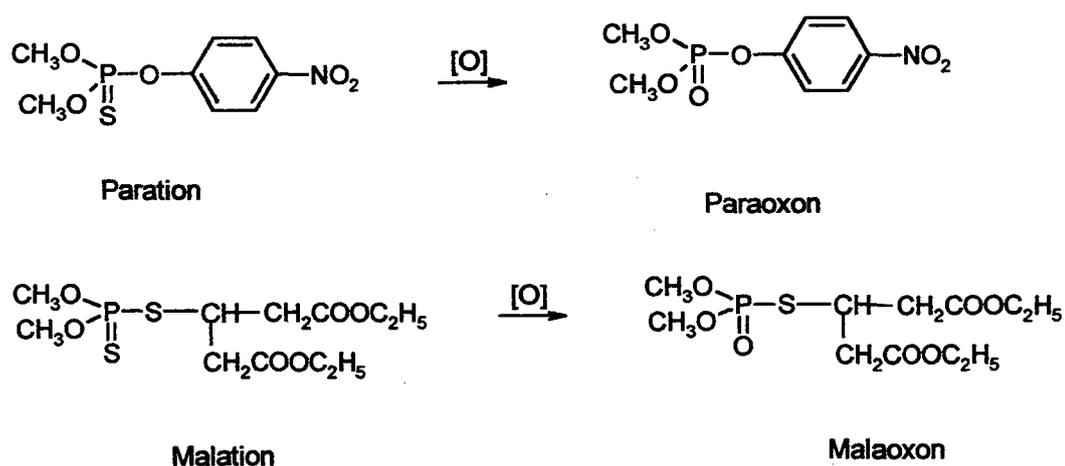


Figura 4 - Produtos de oxidação dos POPs paration metílico e malation

## **I.7 - Objetivos**

### **Gerais:**

Desenvolver métodos de extração e purificação a fim de determinar e monitorar o conteúdo de pesticidas organofosforados mais encontrados em tomates na grande Florianópolis.

### **Específicos:**

Caracterizar os pesticidas organofosforados metamidofós, acefato, paration metílico, que são os mais utilizados em culturas de tomates na região da Bacia do Cubatão-Sul na grande Florianópolis.

Buscar melhores técnicas de extração, como o tipo de extração e solventes utilizados, para uma remoção efetiva dos resíduos da matriz.

Otimizar métodos de purificação e, ou pré-concentração, buscando uma melhor recuperação dos analitos, bem como eliminação de possíveis interferentes da matriz.

## I.8 - Justificativa

O Brasil, desde a década de 70, tem merecido lugar de destaque entre os maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, ocupando hoje o terceiro lugar no mercado mundial, depois dos Estados Unidos e do Japão.<sup>43</sup>

O uso inadequado e excessivo de pesticidas leva à ocorrência de resíduos tóxicos nos alimentos, tendo como conseqüência, o comprometimento da saúde do Homem, além da contaminação do ambiente.<sup>1,44</sup>

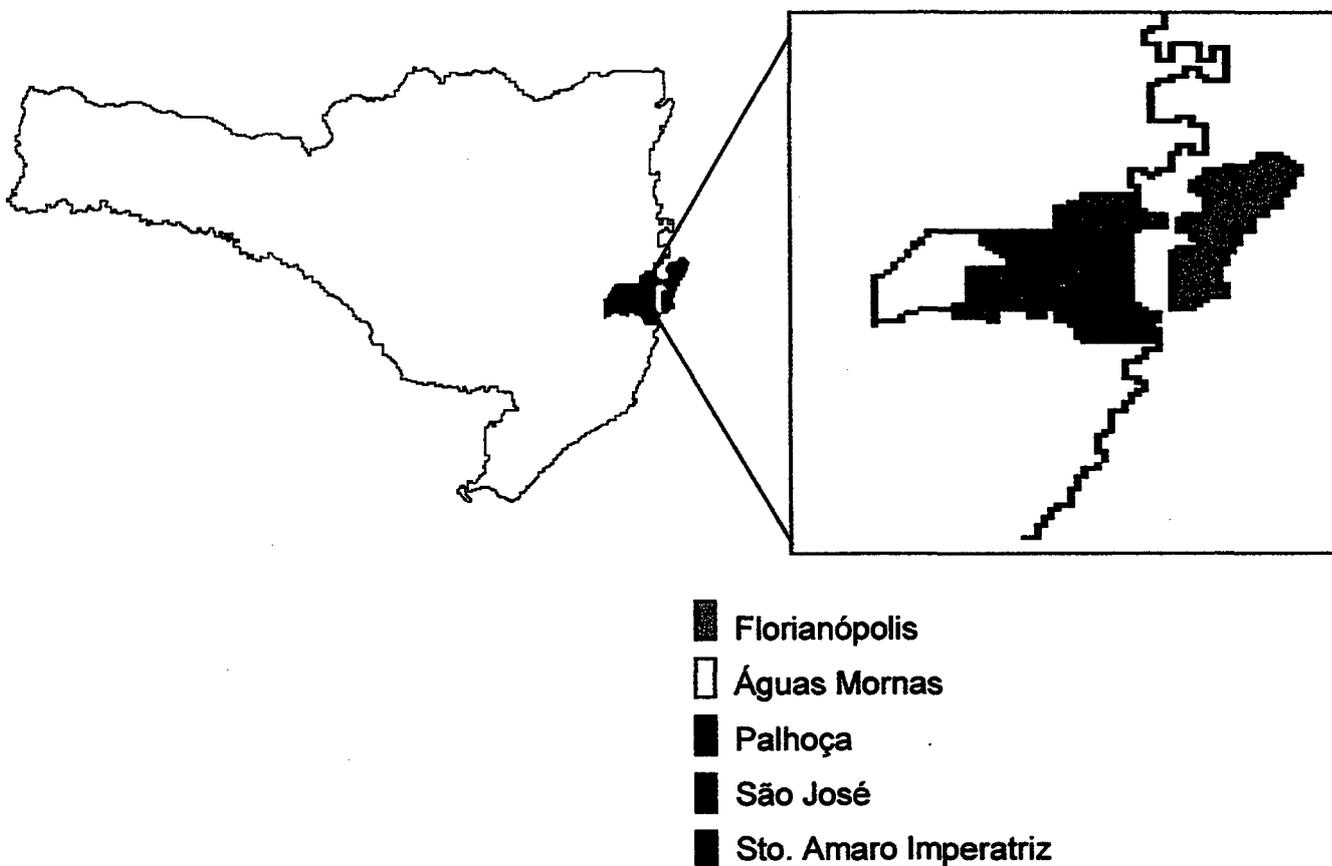
Destaca-se aqui a região da bacia do Cubatão-Sul, que abrange os municípios de Santo Amaro da Imperatriz, Águas Mornas e parcialmente São José e Palhoça, na grande Florianópolis (Esquema 1). Nesta região são desenvolvidas atividades agrícolas, com cerca de 620 ha dedicados à cultura de tomate, utilizando uma média anual de 46,5 Kg de agrotóxicos por hectare o que significa uma aplicação anual de 30 toneladas de agrotóxicos, somente na cultura de tomate. Esta região é a maior produtora de tomate do Estado, sendo empregados organofosforados altamente tóxicos, como o metamidofós, acefato e o paration metílico.<sup>45</sup>

Atualmente os pesticidas com princípio ativo da classe dos organofosforados são os mais empregados na agricultura, no combate a vários tipos de pragas. A utilização dessa classe de pesticidas é favorável, se comparada a dos organoclorados (têm uso proibido pela alta persistência no ambiente), devido uma maior facilidade de degradação.

No entanto, os POPs <sup>→ pesticidas organofosforados</sup> são caracterizados por possuírem uma toxicidade maior, atuando como inibidores da enzima acetilcolinesterase (importante neurotransmissor), e ainda por permanecerem nos alimentos, visto a indiscriminada aplicação pelos agricultores.<sup>26,43,46,47</sup>

Desta forma, diante de um mercado tão ativo, com centenas de novas formulações a cada dia, e da problemática educação para o uso adequado dos agrotóxicos (incluindo a não observância do tempo de carência), impõe-se a necessidade do controle de qualidade, do monitoramento do conteúdo de resíduos

de pesticidas nos alimentos. Especificamente em tomate, uma cultura extremamente dependente de agrotóxicos.



Esquema 1 - Localização da região da Bacia do Cubatão-Sul na grande Florianópolis.

## CAPÍTULO-II

### PARTE EXPERIMENTAL

#### II-1 Material

##### II-1.1 Reagentes

↳ Sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) - Nuclear, aquecido a  $400^\circ\text{C}$  por 4 horas.<sup>14</sup>

↳ MgO - Nuclear

↳ Sílica gel ( $\text{SiO}_2$ ) para Cromatografia,  $0,05 \div 0,20\text{mm}$  - Carlo Erba reagenti.

↳ Carvão ativado - Merck nº 2186.

Purificação: 10 g de carvão ativado foram tratados com 100 mL de HCl 3 mol/L e aquecidos por 5 minutos. A solução foi filtrada, e o tratamento com HCl foi repetido duas vezes. Finalmente o carvão ativado foi lavado com água ultra-pura.<sup>48,49</sup>

Anteriormente ao uso, o carvão ativado foi lavado com 20mL de acetato de etila em sistema de vácuo (membrana  $0,45\mu\text{m}$ , 47mm de diâmetro) e levado para secagem em estufa a  $130^\circ\text{C}$  por 48 horas.<sup>23</sup> Nos processos de filtragem as partículas menores do carvão ativado foram removidas.

↳ Mini-colunas disponíveis de C18, octadecilsiloxano- 500mg, 3mL, obtidas pela Supelco.

↳ Florisil - 15% MgO, 84%  $\text{SiO}_2$ , 1%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  - preparada em laboratório.

Florisil (100g) foi colocada em refluxo por 1hora em 500mL de água ultra-pura. Após decantada a água, o procedimento foi repetido por 3 vezes. A água foi removida por filtragem a vácuo e em seguida a florisil foi aquecida a  $150^\circ\text{C}$ , reativada a  $600^\circ\text{C}$  por 2 horas e conservada em dessecador. No caso de utilização da florisil após alguns dias, a mesma é reaquecida a  $150^\circ\text{C}$  por 2 horas.<sup>20</sup>

↳ Os padrões dos pesticidas metamidofós (99% de pureza), acefato(98% de pureza), paration metílico(99% de pureza), malation (99% de pureza), foram obtidos junto a Hellma Sulamerica Importações e Exportações.

## **II-1.2 Outros materiais**

↳ Algodão de vidro - Synth, Labsynth Produtos para laboratórios.

O algodão de vidro foi extraído três vezes em ultra-som com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  por 15 minutos.

↳ Membranas de acetato de celulose,  $0,45\mu\text{m}$ , 47mm de diâmetro, da Millipore

## **II-1.3 Solventes**

Acetona, diclorometano, acetato de etila, todos marca Mallinckrodt, grau pesticida (99,9% de pureza), obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Representações Ltda; Metanol para CLAE, da Reagen.

## **II-1.4 Equipamentos**

↳ Cromatógrafo Gasoso

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás , modelo Hewlett Packard 6890\*, equipado com um detector de nitrogênio e fósforo a  $300^\circ\text{C}$ . As injeções( $1\mu\text{L}$ ) foram manuais com injetor do tipo "split/splitless" a  $210^\circ\text{C}$ , com fluxo do gás carreador constante de 3 mL/min. Modo de injeção: splitless (0,75min a fluxo de 60 mL/min). As separações ocorreram em uma coluna capilar HP-5 (5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano) de 30m x 0,25 mm di e espessura do filme de  $0,25\mu\text{m}$  com a seguinte programação de temperatura no forno:  $40^\circ\text{C}$  com taxa de aquecimento  $20^\circ\text{C}/\text{min}$ . até  $220^\circ\text{C}$ , e isoterma de 5 min. Gases; fluxo de  $\text{H}_2$ : 3 mL/min , fluxo de ar: 60 mL/min, fluxo make-up+coluna: 10mL/min. A quantificação dos analitos para os estudos de recuperação foi realizada pelo método da padronização externa, com média de três injeções para cada amostra analisada.

↳ Ultra-som - Thornton, INPEC Eletrônica S.A..

↳ Sistema Manifold para EFS e/ou PFS em mini-colunas, acoplado à bomba de vácuo.

\* LIMA - Engenharia Ambiental

- ↳ Liquidificador comum
- ↳ Evaporador rotatório
- ↳ Micro-seringas de 10, 100, 500 $\mu$ L, da Hamilton.
- ↳ Estufa
- ↳ Mufla

## **II-2 Lavagem da vidraria**

Uma solução de detergente neutro DETERTEC 3% foi preparada e aquecida a  $\pm 60^{\circ}\text{C}$ . A vidraria foi lavada com essa solução e escova. Quando a solução não foi aquecida, a vidraria foi deixada de molho na mesma por 48 horas.

Em seguida passou-se água destilada por várias vezes e finalmente água ultra-pura.<sup>50</sup>

## **II-3 Amostragem**

As amostras de tomates para estudos de recuperação e linearidade do método foram coletadas na seção de orgânicos do Supermercado Santa Mônica, com as quais foram feitas análises prévias para confirmação da ausência de agrotóxicos.

As amostras foram conservadas a  $-18^{\circ}\text{C}$  até o procedimento de análise.<sup>15</sup>

Os tomates, cerca de 200g, foram cortados e transferidos para um liquidificador, onde foram processados a alta velocidade, por aproximadamente 10 minutos, para uma desintegração completa e obtenção de uma polpa homogênea. Não foi necessário adição de água, visto que o tomate já contém bastante água.

## **II-4 Preparo de soluções e conservação**

Soluções padrões dos POPs, metamidofós, acefato e paration metílico foram preparadas pesando-se exatamente 0,01g de cada padrão, dissolvendo-se em acetona e completando o volume para 10 mL. Solução padrão do malation foi preparada tomando-se 10  $\mu\text{L}$  do mesmo e completando para 10mL. As soluções de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  obtidas foram utilizadas para diluições posteriores.

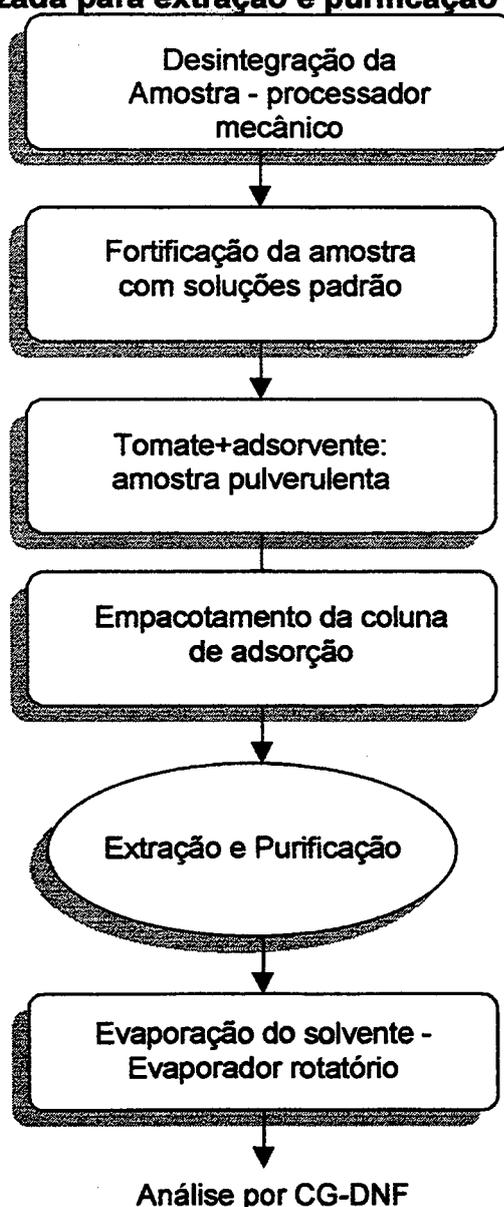
Todas soluções preparadas foram transferidas para tubos com tampa de rosca, previamente envolvidos em papel alumínio (selados com filme de PVC) para proteção da luz.<sup>50</sup>

As soluções foram conservadas a 4°C e checadas freqüentemente devido a possibilidade de degradação ou evaporação, especialmente ao se verificar algum problema na recuperação dos padrões.

## II-5 Metodologia

### II-5.1 Método Dispersão de Matriz de Fase Sólida

#### Metodologia utilizada para extração e purificação das amostras



Esquema 2 - Procedimento geral realizado na análise de POPs para extração e purificação das amostras pelo DMFS.

### **II-5.1.1 Método Dispersão de Matriz de Fase Sólida utilizando florissil.**

Foram pesados 5g da polpa homogeneizada e transferidos para um gral, juntamente com 10g de Florissil, obtendo-se uma amostra pulverulenta, com ajuda de um pistilo. A florissil utilizada foi preparada conforme procedimento relatado na Seção II-1.1

Anteriormente a adição da florissil, a amostra foi fortificada com 50µL de soluções padrão de metamidofós 20 µg mL<sup>-1</sup>, acefato 40 µg mL<sup>-1</sup>, paration metílico e malation a 10 µg mL<sup>-1</sup>.

A amostra pulverulenta, com os padrões, foi transferida uniformemente para uma coluna de extração de 30 cm sobre uma camada de 5mm de sulfato de sódio, previamente aquecido, e lã de vidro.

Gral e pistilo foram rinçados com 20mL do solvente extrator, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:acetona (9:1), adicionando-se cuidadosamente à coluna e ajustando o fluxo para 5mL/min. Extração completa é realizada com 50mL adicionais do solvente extrator, colocados vagarosamente e completamente à coluna. Uma pequena camada de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> é colocada também no topo da coluna para evitar segregação no empacotamento da mesma.

O eluato foi concentrado para aproximadamente 2 mL no evaporador rotatório e concentrado até secagem por meio de um fluxo leve de nitrogênio. Finalmente o extrato seco é dissolvido em 1 mL de acetona e analisado.

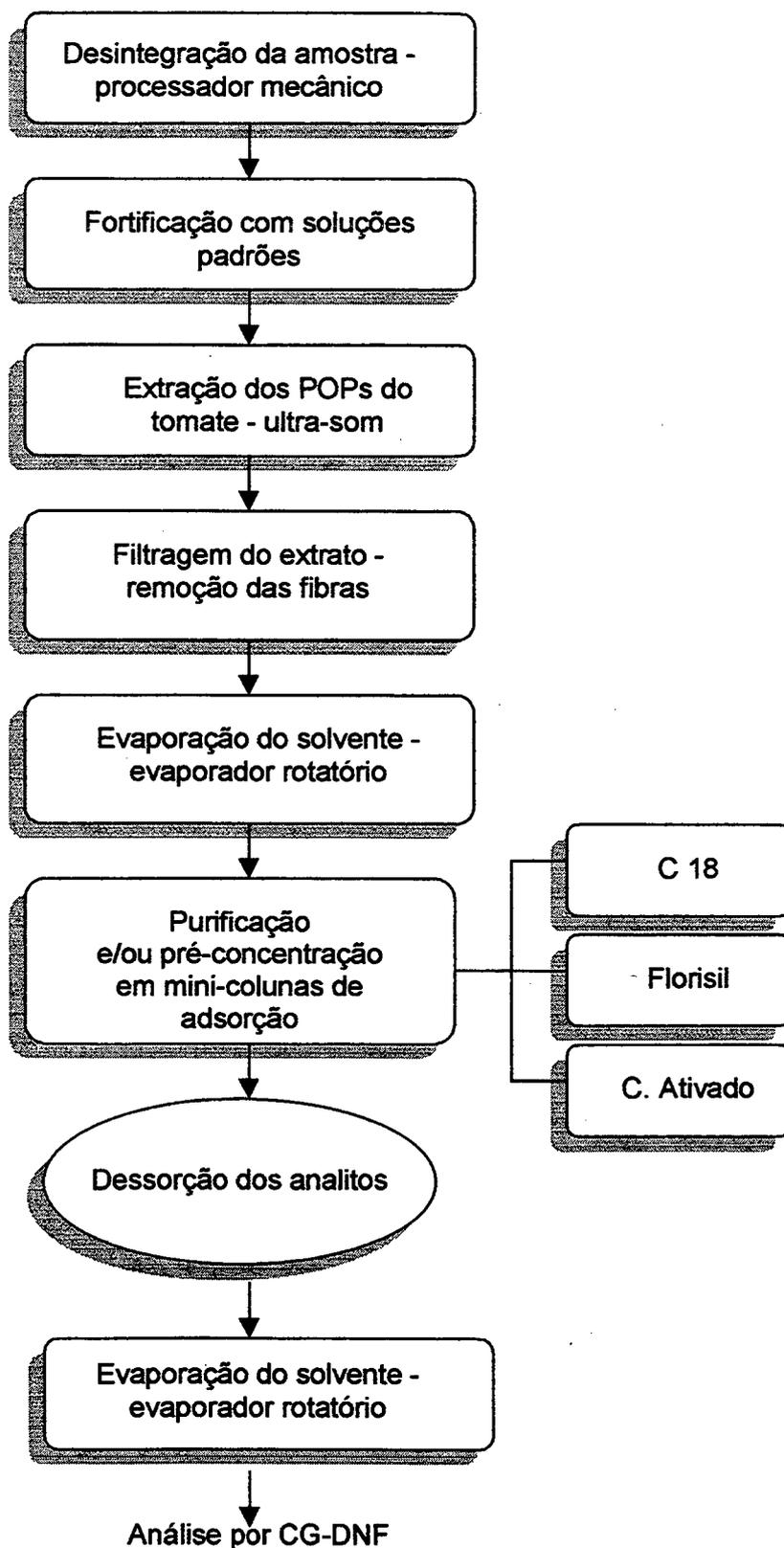
Foram feitos testes utilizando-se 10 e 15g de florissil para 5g de polpa.

A recuperação dos analitos foi determinada pela comparação das áreas dos picos da amostra com as obtidas de misturas de padrões de concentração conhecida, por curvas de Calibração Externa.

A construção das curvas padrões de Calibração Externa foi feita com soluções padrão em concentrações de metamidofós 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 µg mL<sup>-1</sup>; acefato em 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 µg mL<sup>-1</sup>; paration metílico e malation em 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 µg mL<sup>-1</sup>. As soluções padrão eram injetadas no Cromatógrafo Gasoso impreterivelmente no dia de injeção das amostras.

## II-5.2- Método Extração em Fase Sólida

### Metodologia utilizada para extração e purificação das amostras



Esquema 3 - Procedimento geral realizado na análise de POPs para extração e purificação das amostras pelo método EFS

### II-5.2.1 Purificação e/ou pré-concentração em C18

Cinco gramas de amostra, após homogeneização, foram fortificados com 75  $\mu\text{L}$  de solução padrão de acefato  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ , 100  $\mu\text{L}$  de uma solução padrão de metamidofós  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , paration metílico e malation a  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

A extração foi realizada em 20 mL de água por 8 minutos no ultra-som. O extrato foi filtrado a vácuo em uma membrana de acetato de celulose para remoção das fibras. Posteriormente o extrato, após evaporação do solvente para cerca de 2 mL no evaporador rotatório, foi passado em uma mini-coluna de C18, submetida a um sistema "manifold" de vácuo, onde os compostos foram pré-concentrados e eluídos com 5 mL de acetona em uma vazão de 3mL/mim.

O eluato foi concentrado para aproximadamente 2 mL no evaporador rotatório e concentrado até secagem por meio de um fluxo leve de nitrogênio. Finalmente o extrato seco é dissolvido em 1 mL de acetona e analisado.

As mini-colunas de C18 foram previamente condicionadas com 5 mL de acetona, 5 mL de metanol e 5 mL de água.

Foram realizados outros experimentos nas mesmas condições anteriores, porém com diferentes solventes para extração dos POPs do tomate e eluição do adsorvente, conforme ilustrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Otimização de solventes utilizados para extração e purificação em C18

Extração	Eluição (5mL)
Água	Acetona
Água	Acetona-metanol (1:1)
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -acetona(9:1)	acetona
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -acetona(1:1)	acetona

### **II-5.2.2 Purificação e/ou pré-concentração em carvão ativado**

Cinco gramas de amostra, após homogeneização, foram fortificados com 75  $\mu\text{L}$  de solução padrão de acefato  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ , 100  $\mu\text{L}$  de uma solução padrão de metamidofós  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , paration metílico e malation  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Em seguida foram extraídas em 20 mL de acetato de etila por 8 minutos no ultra-som.

Os extratos foram filtrados a vácuo em uma membrana de acetato de celulose (0,45  $\mu\text{m}$ , 47mm de diâmetro) e concentrados para aproximadamente 2 mL no evaporador rotatório.

Foram preparadas mini-colunas de 200 mg de carvão ativado, onde o carvão ativado foi colocado sobre uma camada de 5 mm de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e lã de vidro. Uma camada de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  também foi colocada no topo da coluna para evitar segregação do adsorvente. O carvão ativado foi previamente tratado conforme procedimento relatado na Seção II-1.1

Os extratos concentrados foram passados nas mini-colunas de carvão ativado, previamente condicionadas com 10 mL de acetato de etila, e os analitos foram simultaneamente eluídos com 5 mL de acetato de etila, em uma vazão de 3mL/mim

O eluato foi concentrado para aproximadamente 2 mL no evaporador rotatório e concentrado até secagem por meio de um fluxo leve de nitrogênio. Finalmente o extrato seco é dissolvido em 1 mL de acetona e analisado.

Foram realizados novos experimentos nas mesmas condições anteriores, porém com diferentes solventes para extração e eluição, conforme ilustrado na Tabela 3.

**Tabela 3 - Otimização de solventes utilizados para extração e purificação em Carvão ativado**

<b>Extração</b>	<b>Eluição (10 mL)</b>
Acetato de etila	Acetato de etila
Acetato de etila	Acetato de etila-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (7:3)
Acetona	Acetato de etila-acetona (7:3)

### **II-5.2.3 Purificação e/ou pré-concentração em florisil**

Cinco gramas de amostra, após homogeneização, foram fortificados com 75 µL de solução padrão de acefato 40 µg mL<sup>-1</sup>, 100 µL de uma solução padrão de metamidofós 20 µg mL<sup>-1</sup>, paration metílico e malation 10 µg mL<sup>-1</sup>.

A extração foi realizada em 20 mL de acetato de etila por 8 minutos no ultrassom. O extrato foi filtrado a vácuo em uma membrana de acetato de celulose para remoção das fibras. Posteriormente o extrato, após evaporação do solvente para cerca de 2 mL no evaporador rotatório, foi passado em uma mini-coluna de 200 mg de florisil, submetida a um sistema "manifold" de vácuo, onde os compostos foram pré-concentrados e posteriormente eluídos com 10 mL de acetato de etila em uma vazão de 3mL/mim.

O eluato foi concentrado para aproximadamente 2 mL no evaporador rotatório e concentrado até secagem por meio de um fluxo leve de nitrogênio. Finalmente o extrato seco foi dissolvido em 1 mL de acetona e analisado.

As mini-colunas de florisil foram previamente condicionadas com 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

A recuperação dos analitos foi determinada pela comparação das áreas dos picos da amostra com as obtidas de soluções com misturas de padrões de concentração conhecida, por curvas de Calibração Externa.

A construção das curvas padrões de Calibração Externa para os métodos EFS em carvão ativado, C18 e florisil foi feita com soluções padrões em concentrações de metamidofós 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 µg mL<sup>-1</sup>; acefato em 1,0; 2,0; 3,0;

3,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; paration metílico e malation em 0,25; 0,5; 1,0; 2,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As soluções padrão eram injetadas no CG impreterivelmente no dia de injeção das amostras.

Foram realizados outros experimentos nas mesmas condições anteriores, porém com diferentes solventes para extração e eluição, conforme ilustrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Otimização de solventes utilizados para extração e purificação em florissil

Extração	Eluição (10 mL)
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	Acetona
Acetato de etila	Acetato de etila

#### II-6 Procedimento para determinação da linearidade do método.

Para verificação da faixa dinâmica linear do detector com o método EFS-carvão ativado realizou-se o procedimento similar ao da seção II-5.2.2. Na construção da curva a amostra foi fortificada com soluções padrão de acefato e paration metílico para resultar em concentrações no fruto de 0,05; 0,45; 0,55; 1,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Os pontos para o POP metamidofós foram em 0,03; 0,25; 0,35; 1,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Os pontos da curva foram estipulados de acordo com o NRM, onde fez-se um ponto 10 vezes abaixo do NRM, dois próximos ao NRM e um ponto acima.

No primeiro ponto da curva as amostras foram fortificadas com 5  $\mu\text{L}$  de solução padrão de metamidofós a 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 5  $\mu\text{L}$  de uma solução padrão de acefato e paration metílico a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Para o segundo ponto da curva as amostras foram fortificadas com 50  $\mu\text{L}$  de solução padrão de metamidofós a 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 50  $\mu\text{L}$  de uma solução padrão de acefato e paration metílico a 45  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

No terceiro ponto da curva as amostras foram fortificadas com 50  $\mu\text{L}$  de solução padrão de metamidofós a 35  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 50  $\mu\text{L}$  de uma solução padrão de acefato e paration metílico a 55  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

No último ponto da curva as amostras foram fortificadas com 50  $\mu\text{L}$  de solução padrão de metamidofós a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 50  $\mu\text{L}$  de uma solução padrão de acefato e paration metílico a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O extrato seco para todos os pontos da curva foi dissolvido em 2 mL de acetona e analisado.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso, modelo Hewlett Packard 5890\*, equipado com um detector de nitrogênio e fósforo a 300°C. As injeções (1  $\mu\text{L}$ ) foram com injetor automático do tipo "split/splitless" a 220°C, com fluxo carreador constante de 3,72 mL/min. Modo de injeção: splitless, com tempo de purga do septo de 0,75 min e fluxo de purga de 60 mL/min. As separações ocorreram em uma coluna capilar HP-50 (50% fenil e 50% metilpolisiloxano) de 30m x 0,53 mm di e espessura do filme de 1  $\mu\text{m}$  com a seguinte programação de temperatura no forno: 160°C com taxa de aquecimento 5°C/min. até 190°C e isoterma de 7 min., 190°C até 250°C e isoterma de 6 min. Gases; fluxo de H<sub>2</sub>: 3,5 mL/min, fluxo de ar: 110 mL/min, fluxo make-up (He)+coluna: 10mL/min.

Com a finalidade de se avaliar a recuperação dos analitos, optou-se pelo método da comparação das áreas de picos de amostra em relação às obtidas com dissoluções de padrões, por curvas de calibração externa. Esses valores foram comparados com os das amostras obtidas para cada nível de fortificação da polpa. A avaliação de recuperação dos analitos foi realizada em duplicada e para cada amostra fez-se a média de três injeções no CG.

\* Embrapa-SP

## CAPÍTULO-III

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### III-1 Método Dispersão de Matriz de Fase Sólida

Obteve-se uma boa recuperação para o paration metílico e o malation (Tabela 5). No entanto observou-se um alto coeficiente de variação para esses analitos, possivelmente devido a diferenças no empacotamento e atividades de adsorção.

TABELA 5 - Recuperação de POPs pelo método DMFS utilizando o adsorvente florisil

Pesticidas	Fortificação ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	10 g de florisil		15 g de florisil	
		Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
Metamidofós	0,20	-	-	-	-
acefato	0,40	-	-	-	-
Paration Metílico	0,10	97,60	36,33	91,53	26,12
Malation	0,10	86,27	25,03	80,29	35,16

n = 3

Mesmo com a utilização de uma quantidade maior de adsorvente, o método DMFS não mostrou uma boa purificação dos extratos (Figura 5 e 6). Adicionalmente, observou-se que o pigmento do tomate não foi retido pelo adsorvente na coluna de adsorção durante a eluição com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -acetona (9:1).

Os pesticidas metamidofós e acefato, mais polares, não foram recuperados. Essa diferença na recuperação dos organofosforados parece ser dependente da polaridade e da quantidade de florisil utilizada, o que pode ser explicado pela alta atividade de adsorção da florisil em relação aos compostos mais polares e também quando a mesma é utilizada em excesso.<sup>14,20</sup>

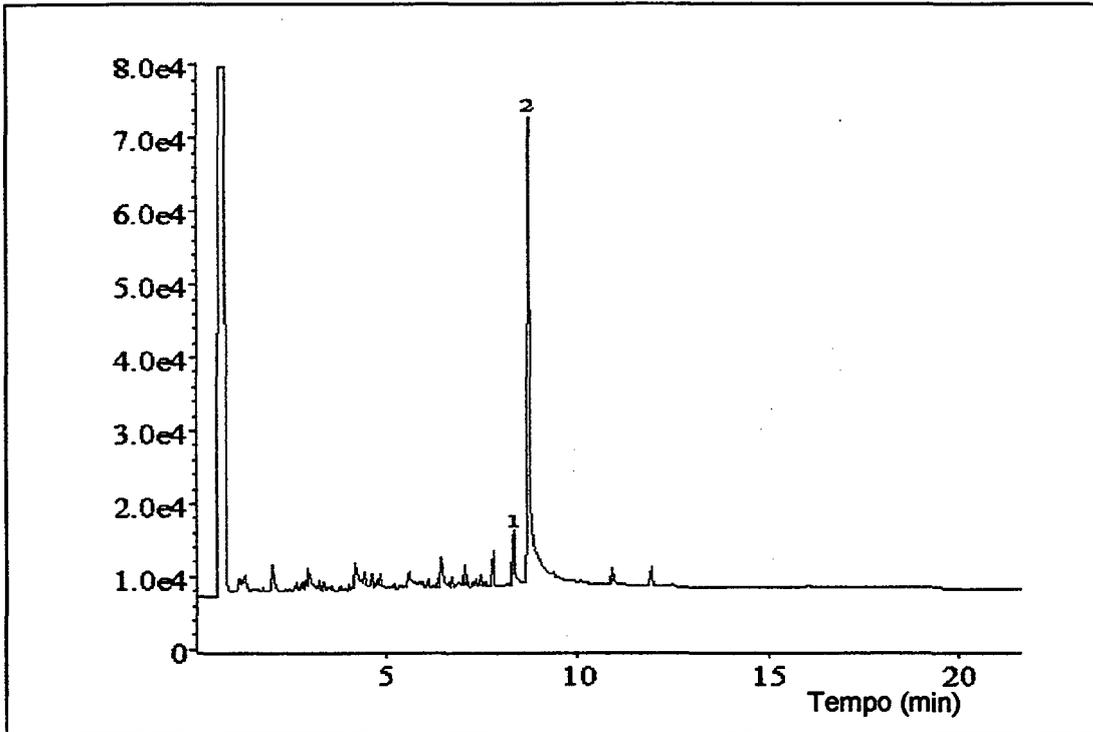


Figura 5 - Cromatograma de recuperação pelo método DMFS utilizando florissil (15g); 1-Paration metílico, 2-Malation

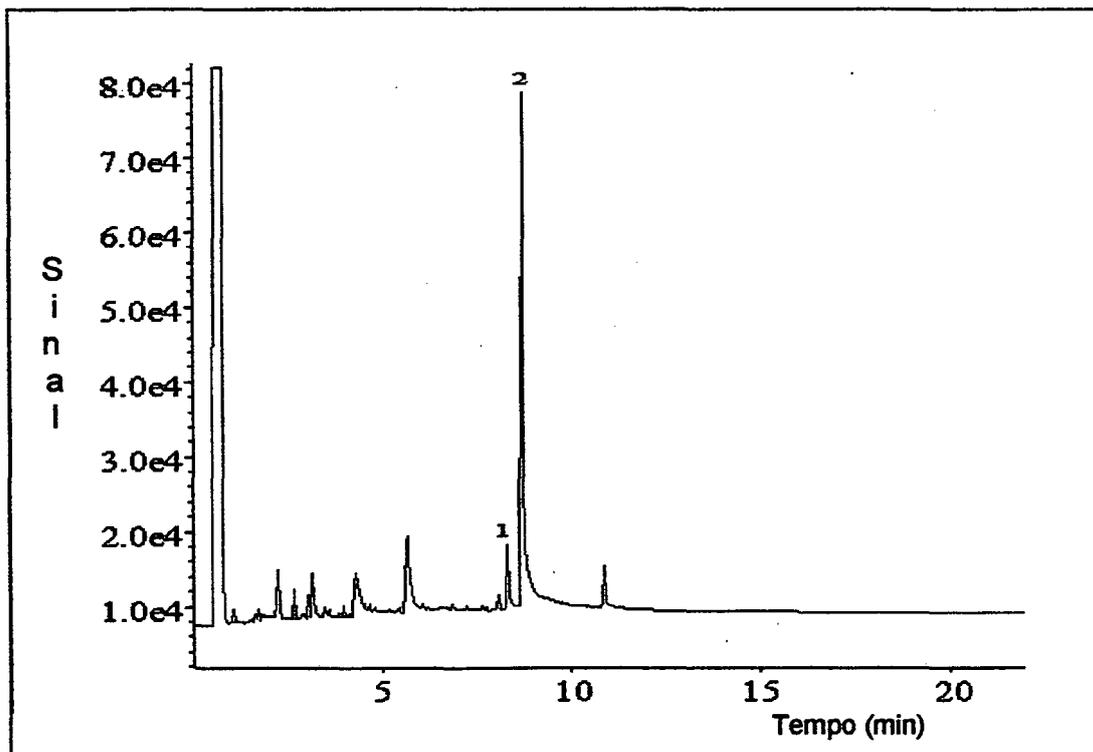


Figura 6 - Cromatograma de recuperação pelo método DMFS utilizando florissil (10g); 1-Paration metílico, 2-malation

Foram realizados testes para a otimização da extração e purificação dos pesticidas mais polares, onde se conseguiu uma melhora na recuperação, fazendo-se a extração dos mesmos em ultra-som, juntamente com a florissil e o solvente de eluição. Este mecanismo demonstrou envolver intenso contato do solvente com a matriz da amostra e conseqüentemente uma boa extração dos POPs da matriz de tomate, já que a adsorção dos analitos à florissil pode ser negligenciável quando saturados com o solvente.

### III-2-Método Extração em Fase Sólida utilizando Florissil

A recuperação geral dos analitos pelo método EFS com florissil apresentou-se baixa (menor que 20%). Para o pesticida metamidofós conseguiu-se uma melhor recuperação (20%), como pode ser visto pelos cromatogramas de extração nas Figuras 7 e 8.

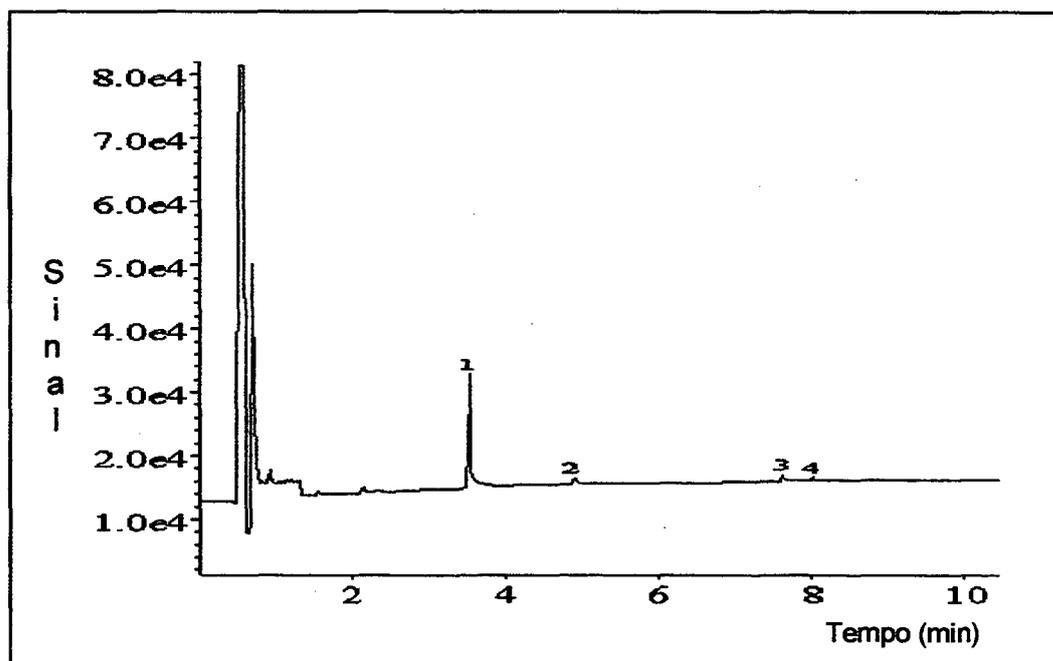


Figura 7 - Cromatograma de recuperação por EFS utilizando florissil. Extração em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e eluição em acetona; 1-metamidofós, 2-acefato 3-Paration metílico, 4-malation.

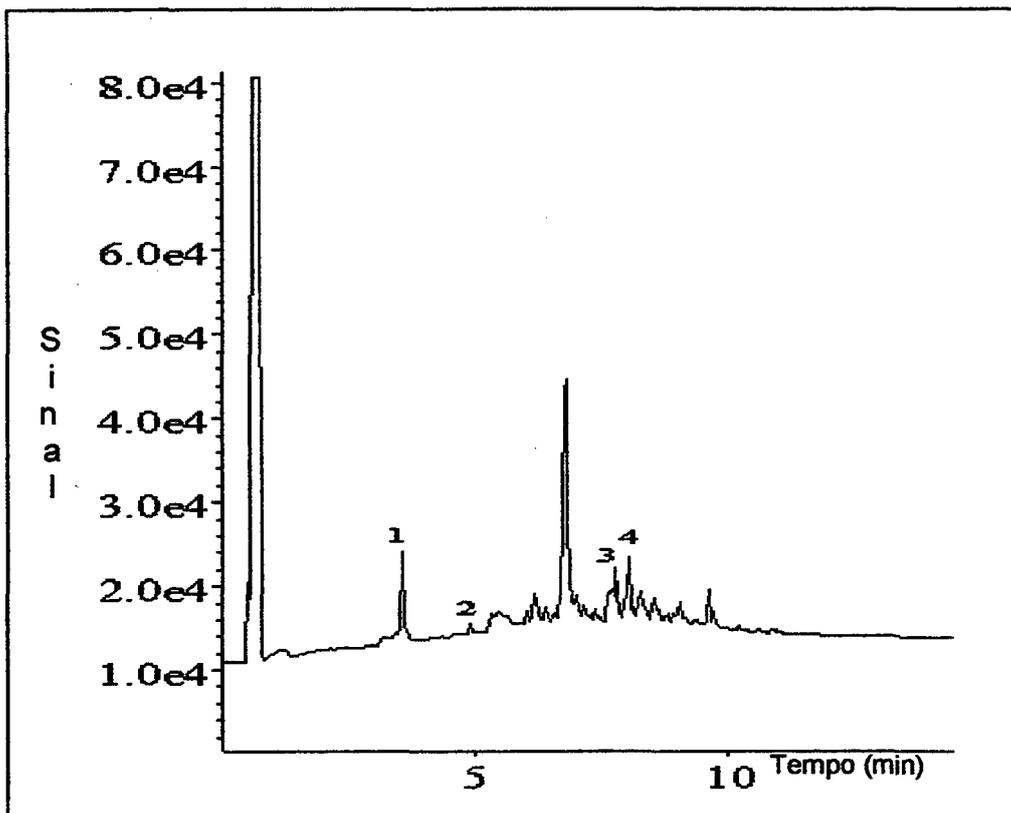


Figura 8 - Cromatograma de recuperação por EFS utilizando florisil. Extração e eluição em acet. de etila; 1-metamidofós, 2-acefato 3-Paration metílico, 4-malation.

A baixa recuperação (menor que 20%) observada para os analitos 2, 3, 4 (Figura 7) mostrou que a extração da amostra em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  não permitiu a pré-concentração dos mesmos pela mini-coluna de florisil, ficando provavelmente dissolvidos no  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , não demonstrando afinidade pelo adsorvente. Por outro lado, uma melhor recuperação para o metamidofós pode ser devido a uma alta atividade em relação ao adsorvente, no entanto observou-se dificuldades na sua dessorção.

Adicionalmente, apesar do  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , não ser um solvente apropriado para extração dos POPs, devido à propriedade aquosa da matriz de tomate, a presença do mesmo é importante para pré-concentração dos analitos (mais polares) no adsorvente florisil, sem a qual ocorreria uma competição de um solvente mais polar com os analitos pelo adsorvente florisil, não propiciando a adsorção dos mesmos.

Na eluição com um solvente mais apolar que a acetona, como o acetato de etila, observou-se a presença de muitos interferentes (Figura 8).

Conforme o esperado, ocorreu uma pequena melhora na recuperação dos POPs malation e paration metílico, e uma baixa recuperação para os analitos mais polares metamidofós e acefato, onde os mesmos certamente foram retidos pela florissil.

Outra explicação para a baixa recuperação geral observada para os POPs pode ser devido à pequena quantidade do adsorvente (200 mg), resultando em incompleta retenção.

Uma vantagem observada para a mini-coluna de adsorção florissil, durante a passagem da amostra com extração em CH<sub>2</sub> Cl<sub>2</sub>, foi a não retenção do pigmento do tomate, onde posteriormente os analitos podem ser eluídos sem muitos interferentes (Figura 7).

### III-3 Método Extração em Fase Sólida utilizando C18

Mini-colunas de adsorção de C18 têm sido muito utilizadas para pré-concentração de traços de pesticidas em água pela U.S. EPA<sup>51,52</sup> e em amostras aquosas, como de frutos e vegetais.<sup>2,12,53.</sup>

Pela Tabela 6 observa-se uma baixa recuperação para os analitos mais polares, que certamente não foram adsorvidos pela C18 devido a diferenças na atividade de adsorção. Por outro lado, conseguiu-se uma boa recuperação para o malation, com um pequeno coeficiente de variação.

TABELA 6 - Recuperação de POPs pelo método EFS utilizando o adsorvente C18 Extração em água e eluição com acetona

Pesticidas	Fortificação ( $\mu\text{gg}^{-1}$ )	Recuperação (%)	CV (%)
Metamidofós	0,40	-	-
Acefato	0,60	30,76	18,30
Paration Metílico	0,20	63,77	9,06
Malation	0,20	82,66	3,45

n = 3

No entanto para o paration metílico, analito menos polar, observou-se uma baixa recuperação, que pode ser explicado por uma pequena força do solvente de eluição ou um insuficiente volume para sua dessorção.

Apesar do adsorvente C18 mostrar-se apropriado para recuperação de POPs menos polares, não se conseguiu uma purificação da matriz de tomate, como pode ser observado pelos interferentes presentes no cromatograma de extração (Figura 9).

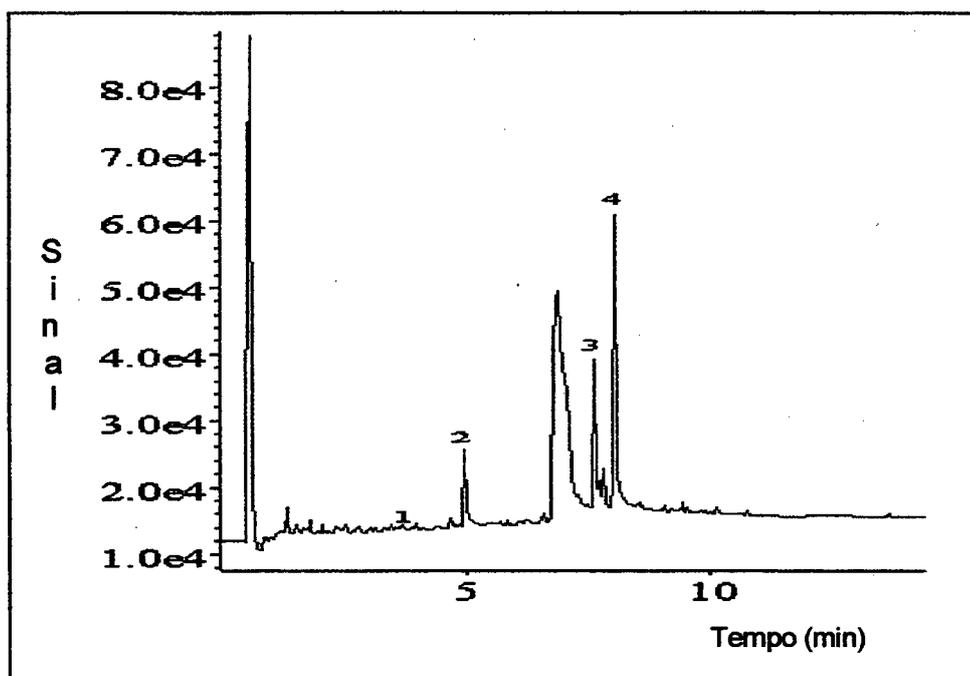


Figura 9 - Cromatograma de recuperação por EFS utilizando C18. Extração em água e eluição em acetona; 1-metamidofós, 2-acefato, 3-Paration metílico, 4-malation.

O adsorvente C18 mostrou reter o pigmento do tomate durante a passagem da amostra<sup>12</sup>, porém no processo de eluição com acetona, o pigmento foi dessorvido, o que possivelmente acarretou a presença de interferentes co-extrativos.

Conseguiu-se uma boa purificação do extrato com o experimento realizado utilizando um gradiente de eluição acetona-metanol (1:1). Em contrapartida, a força do solvente não foi suficiente para dessorção do paration metílico e do malation, obtendo-se uma menor recuperação (menor que 15%) para os mesmos (Figura 10). A ausência de interferentes, utilizando-se o eluente acetona-metanol,

em relação à acetona, infere uma possível característica menos polar para os interferentes observados.

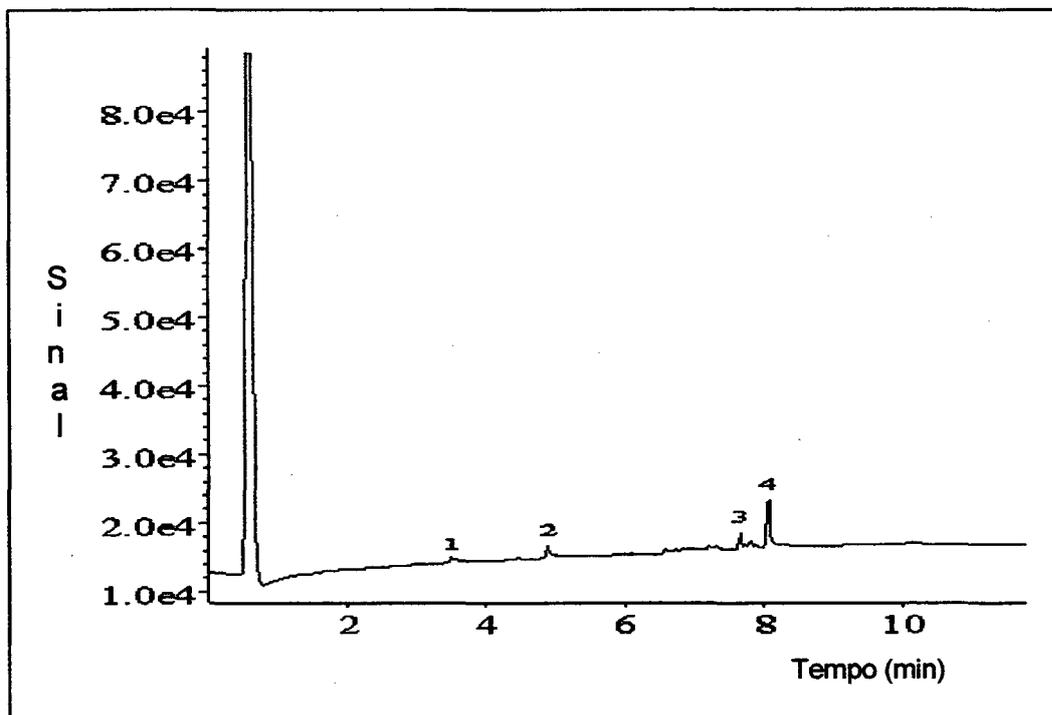


Figura 10 - Cromatograma de recuperação por EFS utilizando C18.  
Extração em água e eluição em acetona-metanol;  
1-metamidofós, 2-acefato, 3-Paration metílico, 4-malation.

A realização de um experimento no qual utilizasse uma maior força do solvente de eluição (solvente menos polar que a acetona), resultaria em uma melhor recuperação do analito paration metílico, no entanto acarretaria a presença de interferentes co-extrativos, o que não é compatível com uma análise de traços

Uma melhora na recuperação do acefato (45%) e a recuperação do metamidofós foi alcançada (apesar de baixa), fazendo-se a extração da amostra em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -acetona (9:1), no entanto os analitos menos polares não foram recuperados (Figura 11).

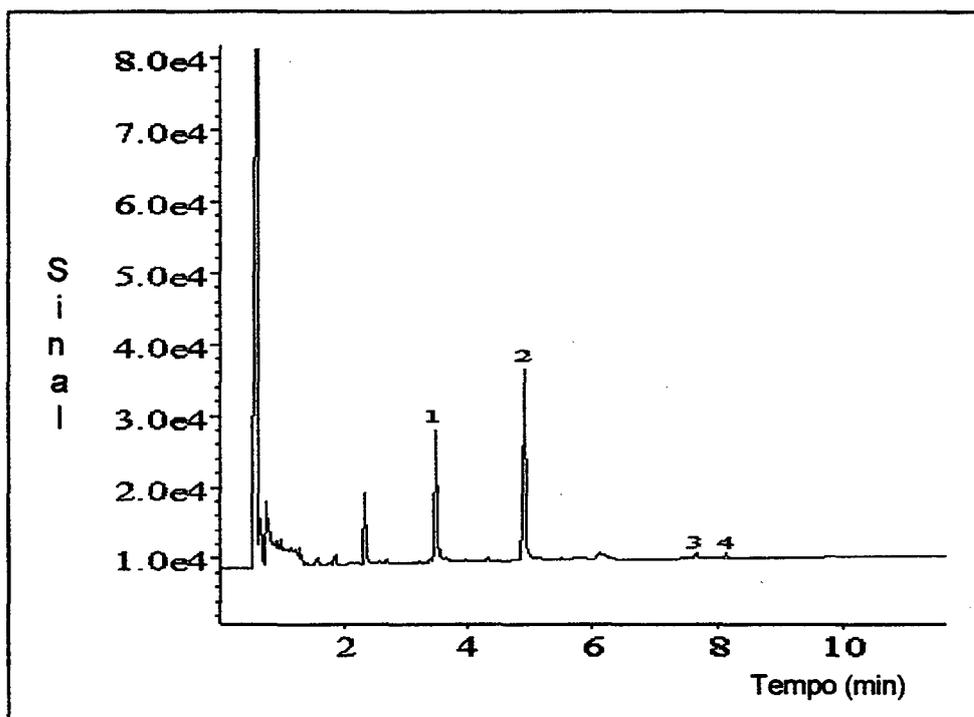


Figura 11 - Cromatograma de recuperação por EFS utilizando C18. Extração em água e eluição em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -acetona (9:1); 1-metamidofós, 2-acefato, 3-Paration metílico, 4-malation.

#### III-4 Método Extração em Fase Sólida em Carvão Ativado

O adsorvente carvão ativado tem sido muito utilizado para purificação de extratos de plantas e outras matrizes, especialmente para recuperação de POPs mais polares, como o metamidofós e acefato.<sup>14,15,23,24,25,26.</sup>

Um menor volume do solvente de eluição (5 mL) não foi suficiente para dessorção dos analitos do adsorvente carvão ativado, como mostram os baixos níveis de recuperação observados na Tabela 7. No entanto, para o POP metamidofós foi obtida uma excelente recuperação, o que pode ser explicado por uma menor força de adsorção (atividade) do carvão ativado em relação ao mesmo.

TABELA 7 - Recuperação de POPs pelo método EFS utilizando o adsorvente carvão ativado. Extração e eluição em acetato de etila

Pesticidas	Fortificação ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Eluição com 5 mL		Eluição com 10 mL	
		Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
Metamidofós	0,40	91,40	9,86	99,49	5,00
acefato	0,60	34,14	11,51	98,96	2,47
Malation	0,20	31,29	4,82	71,67	0,40
Paration Metílico	0,20	-	-		

n = 3

Oteve-se uma recuperação eficaz dos analitos utilizando um volume maior do solvente de eluição, com um pequeno coeficiente de variação para as extrações realizadas (Tabela 7). No entanto, o paration metílico não foi recuperado. As Figuras 12 e 13 mostram os cromatogramas de recuperação para a eluição do carvão ativado com 5 e 10 mL de acetato de etila.

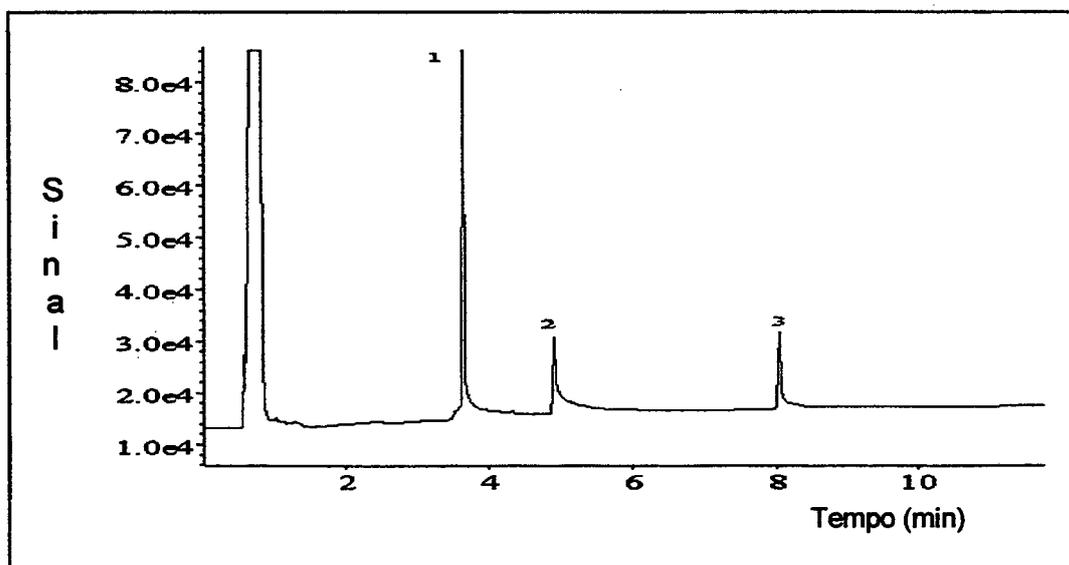


Figura 12 - Cromatograma de recuperação por EFS utilizando C.ativado. Extração e eluição em acetato de etila (5 mL); 1-metamidofós, 2-acefato, 3-malation.

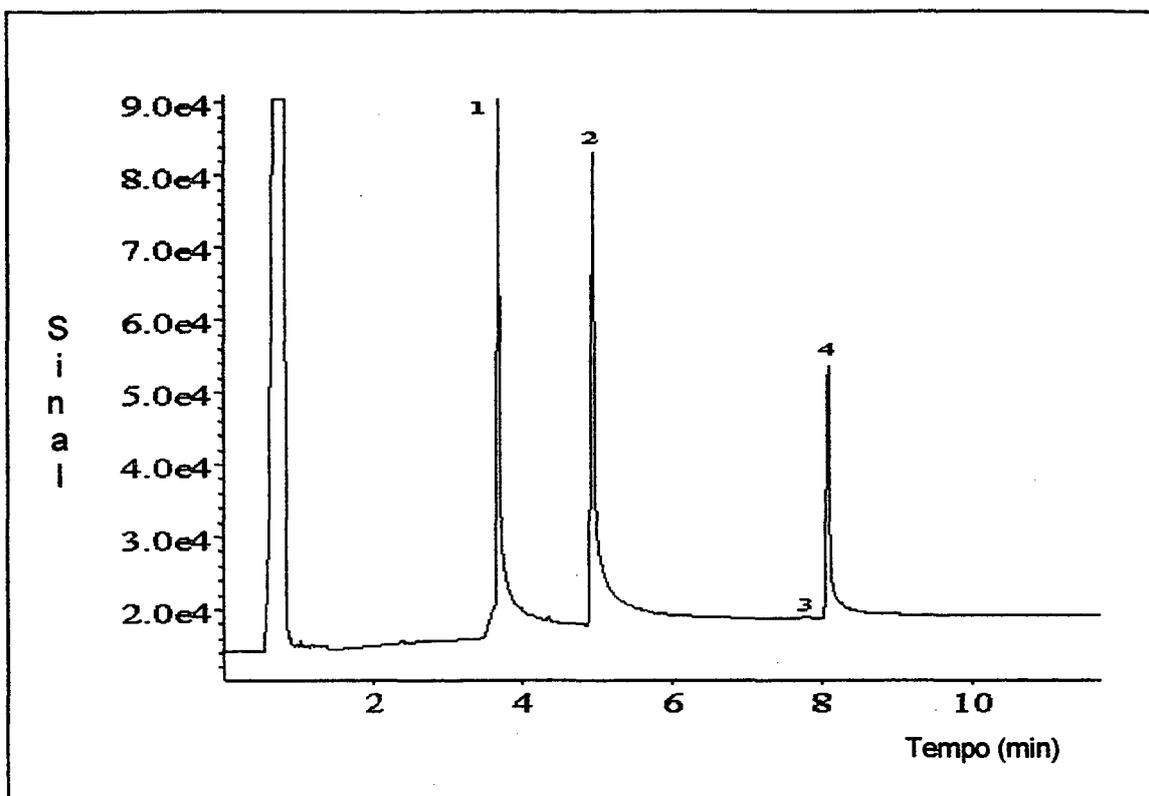


Figura 13 - Cromatograma de recuperação por EFS utilizando C. ativado. Extração e eluição em acetato de etila (10 mL); 1-metamidofós, 2-acefato, 3-Paration metílico, 4-malation.

O carvão ativado demonstrou uma alta força de adsorção em relação aos compostos menos polares. No entanto, conseguiu-se uma melhora na recuperação do paration metílico e uma recuperação razoável para o malation, mudando-se a força do solvente de eluição (Tabela 8).

Na extração e um gradiente do solvente de eluição com acetona observou-se uma menor recuperação para os analitos metamidofós e acefato, bem como uma menor reprodutibilidade (resultando em maiores coeficientes de variação), se comparado a extração e eluição com acetato de etila (Tabela 7). A Figura 14 traz os cromatogramas de extração para esse método.

TABELA 8 - Recuperação de POPs por EFS utilizando o adsorvente C. Ativado, extração em acetona e eluição em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona (7:3).

Pesticidas	Fortificação (μg g <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	CV (%)
Metamidofós	0,40	93,41	4,03
Acefato	0,60	70,44	10,36
Paration Metílico	0,20	52,25	9,78
Malation	0,20	83,00	6,25

n = 3

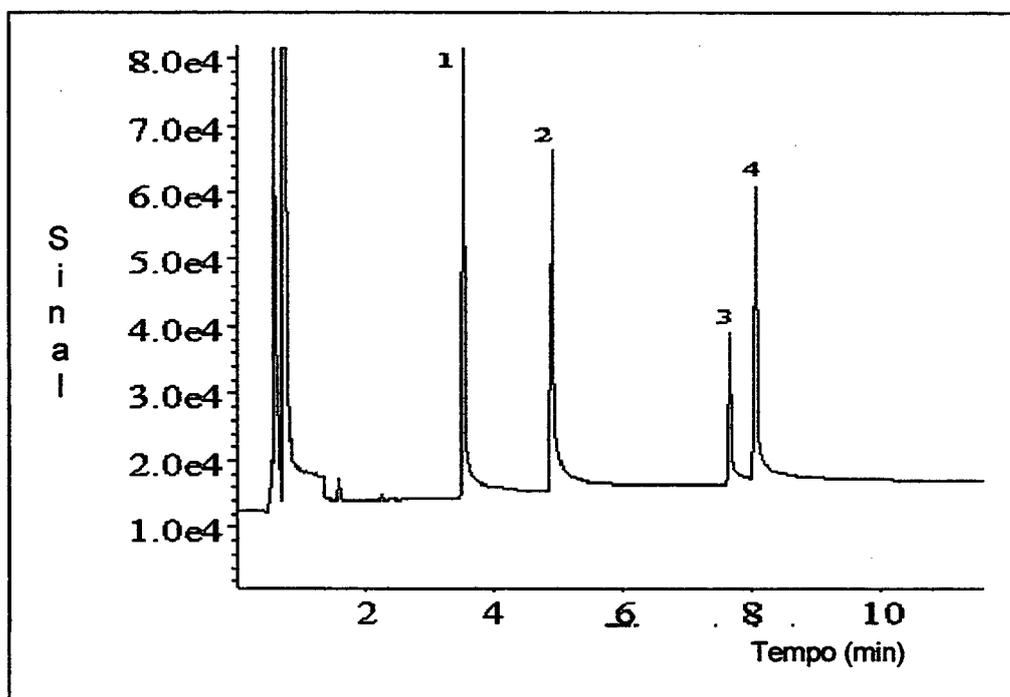


Figura 14 - Cromatograma de recuperação por EFS utilizando C. ativado. Extração em acetona e eluição em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona(7:3); 1-metamidofós, 2-acefato, 3-Paration metílico, 4-malation.

Na perspectiva de uma aumento na força do solvente, utilizando-se CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetato de etila (7:3) como eluente, obteve-se uma excelente recuperação para todos os analitos, especificamente para os POPs paration metílico e malation,

os quais não foram recuperados anteriormente. Os baixos valores de coeficientes de variação para todos os analitos mostraram que o método foi preciso (Tabela 9).

Vale ressaltar que os métodos anteriores de EFS em florissil e C18 também foram precisos, quando os analitos apresentaram baixos coeficientes de variação para os respectivos métodos, apesar dos baixos níveis de recuperação encontrados.

TABELA 9 - Recuperação de POPs por EFS utilizando o adsorvente Carvão ativado. Extração em acetato de etila e eluição em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetato de etila (7:3).

Pesticidas	Fortificação (μgg <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	CV (%)	LD (ngg <sup>-1</sup> )
Metamidofós	0,40	99,01	4,18	0,04
Acefato	0,60	97,18	1,32	0,12
Paration Metílico	0,20	85,21	6,28	0,10
Malation	0,20	100,00	0,75	0,07

n = 3

Considerando a complexidade na seleção do adsorvente em relação as diferenças estruturais entre os analitos, interferentes e matriz da amostra, a recuperação foi quantitativa. Vale ressaltar que a sensibilidade pode ser melhorada usando um volume final menor da solução para análise.

Adicionalmente a possíveis perdas pelo adsorvente (incompleta retenção ou eluição), têm-se perdas devido ao passo de evaporação do solvente e erros inerentes à padronização externa.

O limite de detecção do DNP para os analitos foi calculado a partir dos resultados obtidos para esse método (Tabela 9). Em geral, o limite de detecção é definido como a concentração mínima de um analito na amostra necessária para resultar em um pico com razão sinal-ruído de 3:1.<sup>16,25,47</sup>

Os níveis de fortificação para todos os métodos foram selecionados em valores próximos ao NRM e limites de quantificação para os analitos, os quais foram baseados em experimentos práticos de laboratório onde se verifica a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão.<sup>20</sup> Esse parâmetro

é relativo ao desempenho de colunas e detectores, que pode variar dependendo do tipo de matriz da amostra.

Os analitos mais polares como o metamidofós e o acefato, em adição a uma menor atividade em relação ao adsorvente carvão ativado, mostraram possuir alta solubilidade em acetato de etila, como pôde ser observado pelos altos índices de recuperação quando foram realizadas a extração e eluição neste solvente, inclusive com uso de um pequeno volume de eluição (Tabelas 7 e 9).

Ao contrário do observado para o adsorvente florissil, o carvão ativado reteve todo pigmento do tomate, mesmo na presença do eluente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , mostrando uma excelente purificação para todos os testes realizados, onde não foram observados os interferentes encontrados nos testes realizados com C18 e florissil (Figuras 8 e 9).

Embora seja recomendado pela literatura a extração de POPs de frutos e vegetais em acetona devido a propriedades da matriz, a extração em acetona demonstrou solubilizar muitos interferentes co-extrativos. Enquanto a utilização do acetato de etila propiciou uma eficiente extração dos POPs da matriz, especialmente os mais polares, e resultou em cromatogramas bem mais limpos (Figura 15).

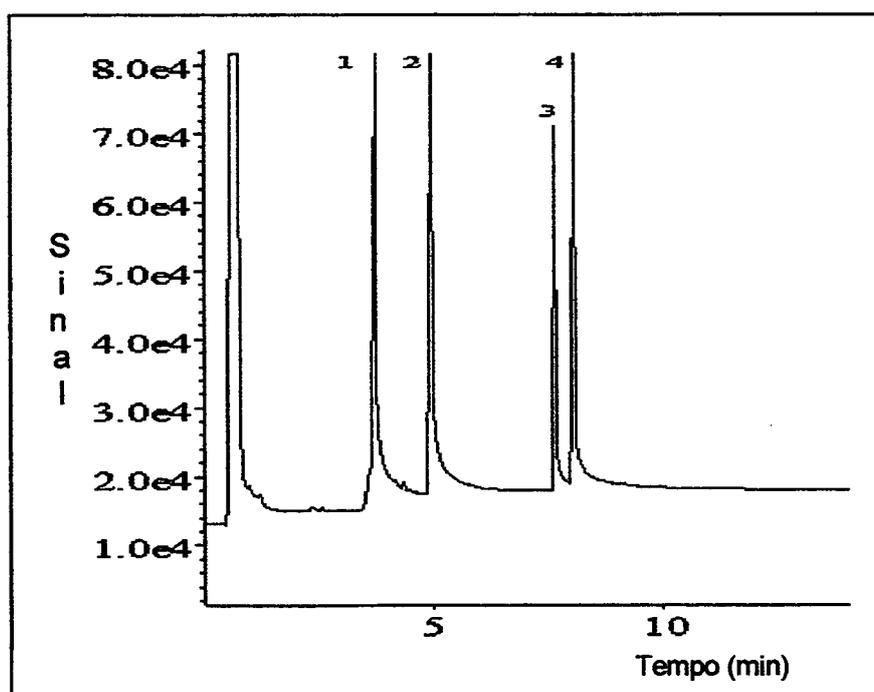


Figura 15 - Cromatograma de recuperação por EFS utilizando C. ativado. Extração em acet. de etila e eluição em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -acet. de etila (7:3); 1-metamidofós, 2-acefato, 3-Paration metílico, 4-malation.

Excelentes resultados têm sido conseguidos com a utilização acetato de etila dentre vários solventes utilizados para extração e eluição de adsorventes em análises de frutos e vegetais, como tem sido reportado em vários trabalhos.<sup>14,15,17,23,25,54.</sup>

O tempo de extração mostrou influenciar bastante na solubilização de interferentes, especialmente com a acetona, onde com um tempo de 8 minutos no ultra-som os analitos foram extraídos com menos interferentes.<sup>6</sup> O ultra-som, pela eficiência de extração observada, assegurou um íntimo contato do solvente extrator com a matriz da amostra, o que levou a uma adsorção negligenciável dos analitos à matriz.

Outro parâmetro que demonstrou influenciar na eficiência de recuperação dos analitos foi a quantidade de adsorvente utilizada, a qual foi otimizada para este método em 200mg. Com uma quantidade de 300 mg de carvão ativado utilizada inicialmente não se conseguiu recuperar os analitos, mostrando dificuldades na dessorção dos mesmos.

A cauda observada nos picos dos analitos estudados mostrou ser uma característica dos mesmos e da pérola do DNF. Cauda nos picos, especialmente na análise de compostos contendo nitrogênio e fósforo, é normal com a pérola de cerâmica, a qual tem um mecanismo de reação diferente em relação às pérolas de vidro usadas previamente em DNFs.<sup>55</sup>

### **III- 4.1 Linearidade para o método**

A faixa dinâmica linear do detector para os analitos estudados foi verificada para o método EFS em carvão ativado nos intervalos de 0,03 - 1,00  $\mu\text{g g}^{-1}$  para o metamidofós e 0,05 - 1,00  $\mu\text{g g}^{-1}$  para o acefato e paration metílico (Figura 16). As curvas indicaram uma boa linearidade do método, apresentando valores de coeficientes de correlação na faixa de 0,996-0,998. Maiores desvios da linearidade foram observados para o metamidofós.

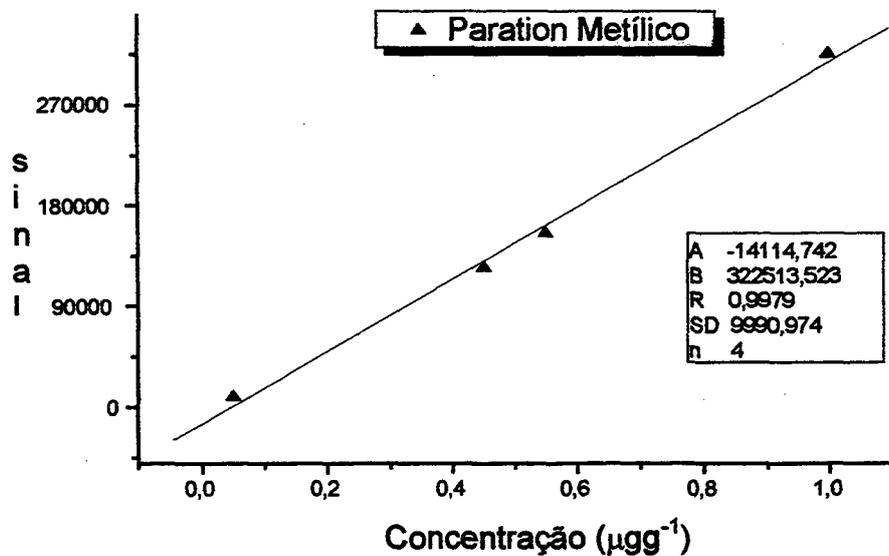
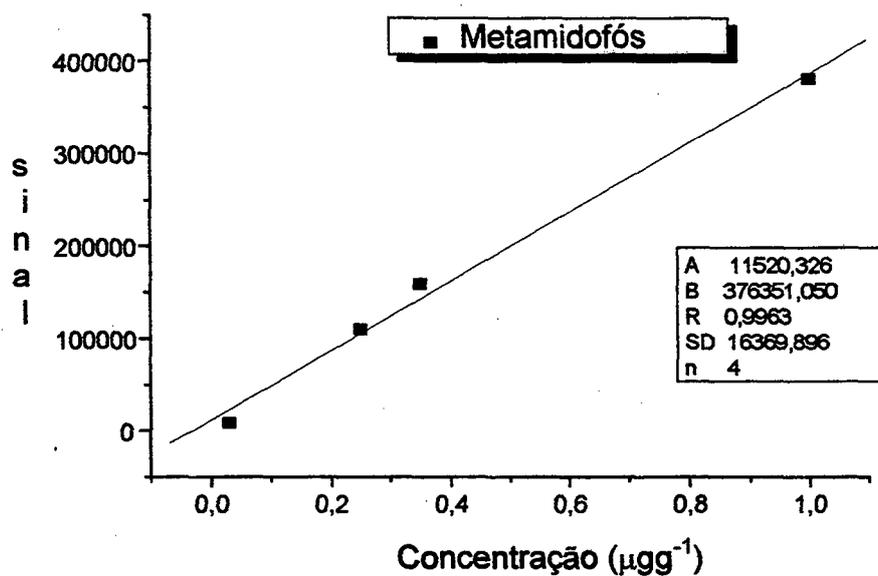
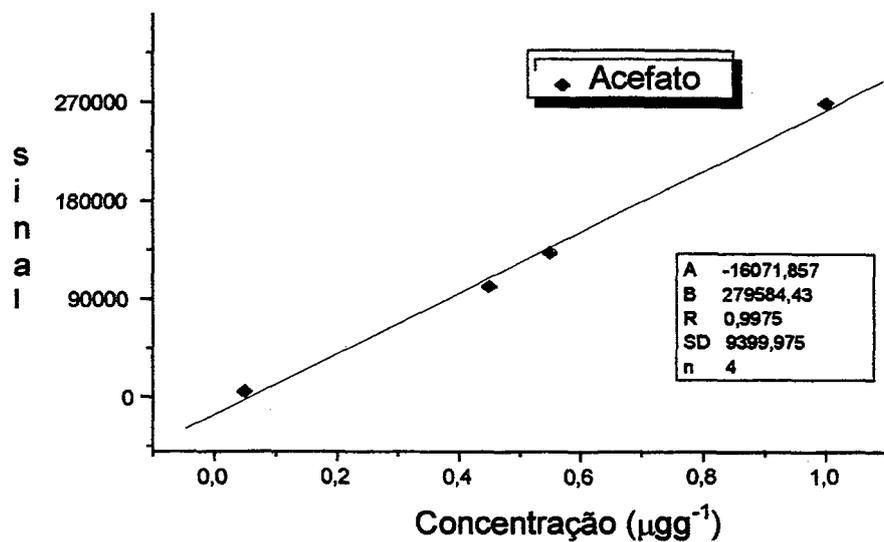


Figura 16 - Faixa linear do método EFS em carvão ativado para os analitos estudados, , nos intervalos de 0,03 - 1,00  $\mu\text{g g}^{-1}$  para o metamidofós e 0,05 - 1,00  $\mu\text{g g}^{-1}$  para o acefato e paration metílico. O experimento foi feito em duplicata.

A eficiência de extração foi calculada para os respectivos intervalos de fortificação, onde se observou uma variação nos níveis de recuperação em relação à concentração, apresentando uma certa proporcionalidade (Figura 17). Exceção é observada para o paration metílico, onde para uma maior fortificação da amostra houve um decréscimo na recuperação, possivelmente devido a um aumento na atividade de adsorção do carvão ativado em relação a este pesticida menos polar quando em alta concentração.

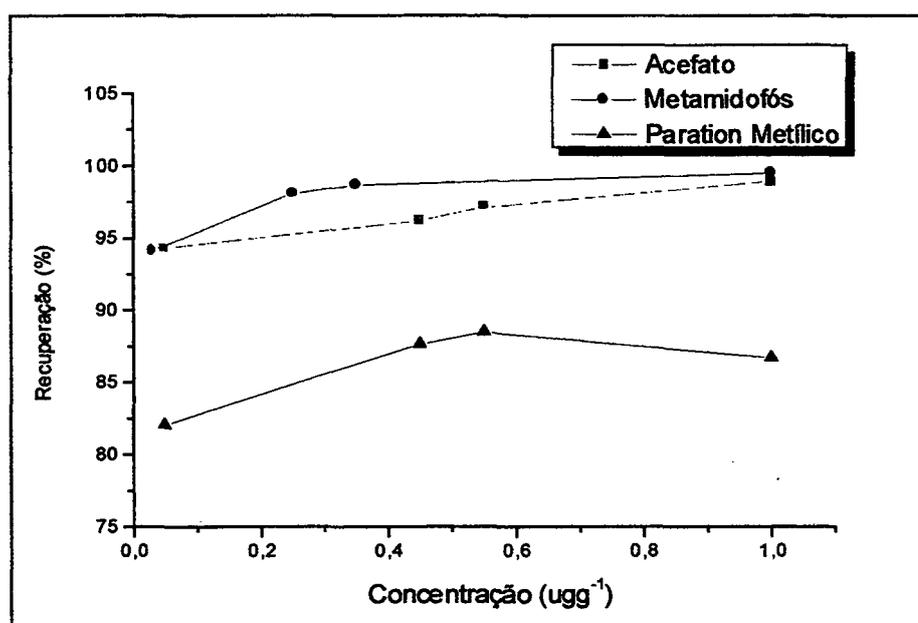


Figura 17 - Eficiência de extração em relação à concentração de fortificação da amostra nos intervalos de 0,03 - 1,00  $\mu\text{gg}^{-1}$  para o metamidofós e 0,05 - 1,00  $\mu\text{gg}^{-1}$  para o acefato e paration metílico, utilizando o método EFS em carvão ativado. Cada ponto corresponde a média de três injeções das amostras com experimento feito em duplicata.

Para valores médios de fortificação da amostra no intervalo utilizado observou-se um comportamento similar para os analitos com pequena variação no nível de recuperação.

## **CAPÍTULO-IV**

### **CONCLUSÕES**

✓ O método Dispersão de Matriz de Fase Sólida (DMFS) mostrou ser simples e rápido, onde a extração e purificação são realizadas simultaneamente, pela mistura da amostra com o adsorvente. No entanto o método não demonstrou ser eficiente para purificação da matriz de tomate.

✓ A técnica de Extração em Fase Sólida (EFS) apresentou vantagens, se comparado aos procedimentos tradicionais de ELL, como simplificação nos passos de extração e purificação, menor consumo de reagentes e menor tempo de análise. Adicionalmente, o método EFS permite, com o uso de mini-colunas de adsorção, uma maior flexibilidade na quantidade de amostra utilizada, a qual decresce consideravelmente o consumo de solventes.

✓ Uma desvantagem, contudo, para EFS e DMFS é que a atividade do adsorvente pode variar de um lote para outro prejudicando a reprodutibilidade do método.

✓ O método EFS permitiu uma flexibilidade também na escolha do tipo de adsorvente, o qual deve ser otimizado em relação às diferenças estruturais entre analitos e interferentes da amostra.

✓ A quantidade de adsorvente, sua força de adsorção, polaridade do solvente ou misturas de solventes para extração e eluição também devem ser selecionados de acordo com as características químicas dos pesticidas e co-extrativos a serem separados.

✓ A utilização de florisil e C18 não pareceu ser apropriada para análise de POPs em tomate, devido a dificuldade de se otimizar a escolha correta de solventes para extração e eluição em relação aos adsorventes (baixa recuperação), tendo em vista a estrutura química dos analitos e interferentes. Uma proposta seria a utilização de procedimentos diferenciados (diferentes solventes para extração e purificação) de EFS em florisil e C18 para determinados analitos, conforme suas polaridades. Para recuperação dos analitos metamidofós e acefato por EFS em florisil, sugere-se a extração da amostra com um solvente mais polar e mudança para um solvente

menos polar anteriormente ao processo de purificação para se conseguir a pré-concentração no adsorvente florisil.

✓ Os testes realizados com diferentes adsorventes e solventes possibilitaram uma caracterização efetiva dos analitos e da matriz da amostra, onde foi observada uma característica menos polar para os interferentes encontrados especificamente com florisil e C18.

✓ O ultra-som demonstrou ser eficiente na extração de POPs da matriz de tomate, visto um contato entre o solvente extrator e a amostra ser um fator determinante para boa recuperação dos pesticidas. Entretanto, no caso de uma amostra real, onde os pesticidas podem estar mais aderidos à matriz da amostra, propõe-se a extração da polpa em um processador mecânico na presença de um solvente ou mistura de solventes, a alta velocidade.

✓ O carvão ativado mostrou ser um excelente adsorvente para analitos polares, como metamidofós e acefato. Por outro lado, apresentou uma maior força de adsorção em relação aos compostos mais apolares, como o paration metílico.

✓ A matriz de tomate, na análise de POPs, demonstrou certa complexidade devido aos interferentes solúveis na extração, como exemplo os pigmentos, que exigiu uma contínua manutenção do CG ("liner", coluna capilar), bem como acarretou uma redução progressiva na sensibilidade do DNF para os analitos.

✓ Uma eficiente purificação foi alcançada com o uso do carvão ativado, especialmente quando a extração e eluição foram feitas em acetato de etila, se comparado ao uso de acetona. O carvão ativado demonstrou ser um excelente adsorvente para pigmentos.<sup>49</sup>

✓ Solvente polar, como a acetona, demonstrou solubilizar muitos interferentes co-extrativos, possivelmente devido a sua solubilidade em água. Foi observada, desta forma, a importância de um solvente suficientemente polar para extração dos POPs mais polares, porém menos solúvel em água, como o acetato de etila.

✓ O método EFS em carvão ativado apresentou uma boa linearidade para os POPs. No caso de uma amostra real a concentração dos analitos seria calculada pela respectiva curva analítica feita para os mesmos, onde todos padrões sofreram o

mesmo procedimento de análise da amostra, não importando o nível de recuperação alcançado para o método.

✓ O limite de detecção calculado para os POPs mostrou ser possível a análise de amostras com concentração bem inferiores ao NRM permitido por lei.

✓ A análise do POPs mostrou exigir uma série de cuidados nos procedimentos analíticos (verificação das soluções padrão, temperatura de evaporação do solvente, secagem dos extratos), em vista das propriedades físico-químicas dos analitos, bem como na limpeza da vidraria para evitar contaminação, já que é uma análise de traços.

✓ O volume final da amostra selecionado para análise em todos testes realizados foi 1 mL e 2 mL para o estudo de linearidade. Para trabalhos futuros, sugere-se a verificação de um volume mínimo limite, no qual ainda tem-se uma boa recuperação, fazendo-se um estudo do comportamento da intensidade de sinal em função da variação do volume final utilizado.

✓ Vale ressaltar a importância de um estudo da degradação na análise de POPs pelo monitoramento do decaimento no fruto ou vegetal, onde a baixa persistência desses compostos infere um questionamento da presença dos mesmos em produtos agrícolas em relação ao tempo de aplicação. Muitas vezes pode-se ter a presença de metabólitos ao invés dos compostos de origem.

✓ A informação necessária sobre a degradação dos POPs em determinadas condições, e conseqüentemente a observância do tempo de carência, não impediria o seu uso pelos agricultores, assim como não implicaria um comprometimento da saúde do homem.

✓ Vale lembrar que cada vez mais é desenvolvida uma infinidade de classes de pesticidas, com diversas estruturas químicas, as quais exigem uma metodologia multi-residual que deverá ser validada com estudos de recuperação.

## REFERÊNCIAS

- 1 - LARA, W. H., BATISTA, G. C. (1992) Pesticidas; *Química Nova*, **15**, 2, 161-166.
- 2 - TORRES, C. M., PICÓ, Y, MAÑES, J. (1996) Determination of pesticide in fruit and vegetables; *Journal of Chromatography A*, **754**, 301-331.
- 3 - MARICONI, F. A. M., ZAMITH, A. P., ARAÚJO, R. R., PINCHIN, R. (1985) *Inseticidas-3 e seu emprego no combate às pragas*, 2ª ed., Nobel, São Paulo, 246 p.
- 4 - TEKEL, J., HATRÍK, S. (1996) Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean-up procedures and selective detectors; *Journal of Chromatography A*, **754**, 397-410.
- 5 - AMBRUS, A., THIER, H. P. (1986) Application of multiresidue procedures in pesticides residues analysis; *Pure & Appl. Chem.*, **58**, 7, 1035-1062.
- 6 - WAN, H. B., WONG, M. K. (1996) Minimization of solvent consumption in pesticide residue analysis; *Journal of Chromatography A*, **754**, 43-47.
- 7 - FODOR – CSORBA, K. (1992) Chromatographic methods for the determination of pesticides in foods; *Journal of Chromatography A*, **654**, 353-367.
- 8 - SAWYER, L. D., McMAHON, B. M., NEWSOME, W. H. (1995) *Pesticide and Industrial Chemical Residues*, AOAC Methods of Analysis, cap. 10, p1-32.
- 9 - DI MUCCIO, A., AUSILI, A., CAMONI, I., DOMMARCO, R., RIZZICA, M., VERGORI, F. (1988) Single-step solid-matrix clean-up of vegetable extracts for organophosphorus pesticide residue determination; *Journal of Chromatography A*, **456**, 149-153.

- 10 - DI MUCCIO, A., DOMMARCO, R., BARBINI, D. A., SANTILIO, A., GIROLIMETTI, S., AUSILI, A., VENTRIGLIA, M., GENERALI, T., VERGONI, L. (1993) Application of solid-phase partition cartridges in the determination of fungicide residue in vegetables samples; *Journal of Chromatography A*, **643**, 363-368.
- 11 - STEINWANDTER, H. (1994) A collaborative study for intermethod comparison I. Micro and macro extraction methods for the determination of organophosphorus pesticides in fruits e vegetables; *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **348**, 688-691.
- 12 - LEE, S. M., PAPATHAKIS, M. L., FENG, H. M. C., HUNTER, G. F., CARR, J. E. (1991) Multipesticide residue method for fruits and vegetables: California Department of Food and Agriculture; *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **339**, 376-383.
- 13 - KOINECKE, A., KRENZIG, R., BAHADIR, M., SIEBERS, J., NOLTING, H. G. (1994) Investigations on the substitution of dichromethane in pesticide residue analysis of plant materials; *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **349**, 301-305.
- 14 - CAI, C. P., LIANG, M., WEN, R. R. (1995) Rapid multiresidue screening method for organophosphate pesticide in vegetables *Chromatographia*, **40**, 7/8, 417-420.
- 15 - DOREA, H. S., TADEO, J. L., SANCHEZ, C. S. (1996) Determination of organophosphorus pesticide residue in fruits by Gas Chromatography with ITD and NPD detection; *Chromatographia*, **43**, 7/8, 380-386.
- 16 - AGÜERA, A., CONTRERAS, M. (1993) Gas Chromatographic analysis of organophosphorus pesticides of horticultural concern; *Journal of Chromatography*, **655**, 293-300.
- 17 - HOLSTEGE, D. M., SCHARBERG, D. L., TOR, E. R., HART, L. C., GALEY, F. D. (1994) A rapid multiresidue screen for organophosphorus, organochlorine,

and n-methyl carbamate insecticides in plant and animal tissues; *Journal of AOAC International*, **77**, 5, 1263-1274.

18 - VIANA, E., MOLTÓ, J. C., FONT, G. (1996) Optimization of a matrix solid-phase dispersion for the analysis of pesticide residues in vegetables; *Journal of Chromatography A*, **754**, 437-444.

19 - TORRE, C. M., PICÓ, Y., REDONDO, M. J., MAÑES, J. (1996) Matrix solid-phase dispersion extraction procedure for multiresidue pesticide analysis in oranges *Journal of Chromatography A*, **719**, 95-103.

20 - KADENCZKI, L., ARPAD, Z., GARDI, I., AMBRUS, A., GYORFI, L., REESE, G., EBING, W. (1992) Column extraction of residue of several pesticides from fruits and vegetables: a simple multiresidue analysis method; *Journal of AOAC International*, **75**, 1 53-61.

21 - AMBRUS, A., LANTOS, J., VISI, E., CSATLÓS, I., SÁRVÁRI, L. (1981) General method for determination of pesticide residues in plant origin, soil, and water. I. Extraction e cleanup; *J. Assoc. off Anal. Chem.*, **64**, 3, 733.4

22 - LORES, E. M., MOORE, J. C., MOODY, P. (1987) Improved silica gel clean-up method for organophosphorus pesticides; *Chemosphere*, **16**, 5 1065-1069.

23 - SZETO, S. Y., MacCARTHY, H. R., OLOFFS, P. C. (1979) The fate of acephate and carbaryl in water; *J. Environ. Sci. Health*, B14 (6), 635-654.

24 - SZETO, S. Y., BROWN, M. J., OLOFFS, P. C. (1982) Simplified method for determining acephate and methamidophos residues in several substrates; *Journal of Chromatography A*, **240**, 526-531.

25 - SUNDARAM, K. M., NOTT, R. (1992) Gas Chromatographic method for simultaneous determination of acephate and methamidophos in bark, cone and seed samples of conifers; *Journal of Chromatography A*, **627**, 300-304.

- 26 - LEE, W. O., LAW, L. M., WONG, S. K. (1996) Determination of methamidophos residues in food remnants; *Food Additives and Contaminants*, **13**, 6, 687-694.
- 27 - MOTOHASHI, N., NAGASHIMA, H., PÁRKÁNZI, C., SUBRAHMANYAN, B., ZHANG, G. W. (1996) Official multiresidue methods of pesticide analysis in vegetables, fruits and soil; *Journal of Chromatography A*, **754**, 333-346.
- 28 - HSU, L. P., SCHATTENBERG, H. J., GARZA, M. M. (1991) Fast turnaround multiresidue screen for pesticide in produce; *J. Assoc. off Anal. Chem.*, **74**,5 286-292.
- 29 - STAN, H. J. (1989) Application of capillary Gas Chromatographic with mass selective detection to pesticide residue analysis; *Journal of Chromatography A*, **467**, 85-98.
- 30 - HONG, J., YUNWOO, E., RHEE, J., KIM, T. (1993) Simultaneous analysis of 25 pesticide in crops using gas Chromatographic and their identification by gas Chromatography-Mass Spectrometry; *Journal of Chromatography A*, **639**, 261-271.
- 31 - SCHACHTERLE, S., BRITTAIN, R. D., MILLS, J. D. (1994) Analysis of pesticide residues in food using Gas Chromatographic-Tandem Mass Spectrometry with a benchtop ion trap Mass Spectrometer; *Journal of Chromatography A*, **683**, 185-193.
- 32 - LARSON, R. A , WEBER, E. J. (1994) *Reaction Mechanisms in Environmental Organic Chemistry*, Lewis Publishers, 433p.
- 33 - LARINI, L., CARVALHO, D. (1987) *Toxicologia*, 2<sup>a</sup> ed., Manole, São Paulo, 315p.

- 34 - BARBERÁ, C. (1974) *Pesticidas Agrícolas*, Ediciones Omega S. A., Barcelona, 569p.
- 35 - WORTHING, C. R., WALKER, S. B. (1983) *The Pesticide Manual - A World Compendium*, The Lavenham Press, London, 7<sup>th</sup> ed.
- 36 - BRASIL - Ministério da Agricultura. *Pesticidas: Métodos de Análises e Informações Técnicas* (1988) Universidade Federal do Paraná, Vol. 1 e 2, Curitiba, 599p.
- 37 - BRASIL - Ministério da Saúde. *Relação de Substâncias para Uso Fitossanitário e Domissanitário*. Portarias do Ministério da Saúde. São Paulo: ILSI, 1995, 716p.
- 38 - HOWARD, P. H., MICHALENKO, E. M., JARVIS, W. F., BASU, D. K., GRAY, D. A., (1943) *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals*, Vol III, Lewis Publishers, Chelsea, MI. 681p.
- 39 - CLAVIJO, M. P., MEDINA, M. P., ASENSIO, J. S., BERNAL, J. G. (1996) Decay study of pesticide residues in apple samples; *Journal of Chromatography A*, **740**, 146-150.
- 40 - CHAU, A. S. Y., ALGHAN, B. K., ROBINSON, J. W. (1992) *Analysis of Pesticides in Water. Vol. II, Chlorine and Phosphorus Containing Pesticides*, CRC Series in Analysis for Environmental Control, Canada, 298p.
- 41 - SCHWARZENBACH, R. P., GSCHWEND, P. M., IMBODEN, D. M. (1992) *Environmental Organic Chemistry*, Wiley Interscience, 681p.
- 42 - ASHOK, K. SINGH (1984) Improved analysis of acephate and metamidophos in biological samples by selective ion monitoring Gas Chromatography - Mass Spectrometry; *Journal of Chromatography A*, **301**, 465-469

- 43 - DOREA, H. S., BARBIRATO, M. A., LANÇAS, F. M. (1997) Método multi-resíduo com Extração em Fase Sólida para análise de diazinon, malation, pirazofós e permetrina em limão "tahiti" por Cromatografia a Gás de Alta Resolução com Detector de Captura de Elétrons (HRGC/ECD); *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, **7**, 109-122.
- 44 - BARRETO, H. C., INOMATA, O. N. K., LEMES, V. R., KUSSUMI, T. A. (1996) Monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos comercializados no estado de São Paulo em 1994; *Pesticidas R. Téc. Cient.*, **6**, 1-12.
- 45 - *Projeto Tecnologias Ambientais para o Desenvolvimento Sustentável da Bacia do Cubatão* - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFSC, 1995.
- 46 - NÓVAK, E. M., FOLLADOR, F. R. (1992) Intoxicações humanas agudas por agrotóxicos inibidores da acetilcolinesterase; *Pesticidas R. Téc. Cient.*, **2**, 37-44.
- 47 - MAGDIC, S., BOLAND-BOYD, A., JINMO, K., PAWLISZYN, J. B. (1996) Analysis of organophosphorus insecticides from environmental samples using Solid-Phase Microextraction; *Journal of Chromatography A*, **736**, 219-228.
- 48 - VANDERBORGHT, B. M., VAN GRIEKEN, R. E. (1977) Enrichment of trace metals in water by adsorption on activated carbon; *Analytical Chemistry*, **49**, 311-316.
- 49 - MORITA, T. ASSUMPÇÃO, R. M. V. (1986) *Manual de soluções, reagentes e solventes*, 2ª ed., Edgard Blücher Ltda, 627p.
- 50 - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY U. S. EPA *Method 8140, Organophosphorus Pesticides*, 1994, 14p.

- 51 - BARCELÓ, D. (1993) Environmental Protection Agency and other methods for the determination of priority pesticides and their transformation products in water; *Journal of Chromatography A*, **643**, 117-143.
- 52 - PATSIAS, J., Mourkidou, P. E (1996) Rapid method for the analysis of a variety of chemical classes of pesticides in surface and ground waters by off-line Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry *Journal of Chromatography A*, **740**, 83-98.
- 53 - ODANAKA, Y., MATANO, O., GOTO, S. (1991) The use of solid bonded-phase extraction as alternative to liquid-liquid partitioning for pesticide residue analysis of crops; *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **339**, 368
- 54 - STEINWANDER, H. (1992) Contributions to the ethyl acetate application in residue analysis II. Micro on-line method for extraction organophosphorus pesticides from fruits, vegetables and feedstuffs; *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **343**, 887-889.
- 55 - HP 6890 Series Gas Chromatography (1995), *Operating Manual*, Manual Part. N°.G1530-90310