

RENATA DOMINGOS ALVES

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO DE ALDICARBE E CARBOFURANO EM
AMOSTRAS DE CAFÉ BEBIDA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010**

RENATA DOMINGOS ALVES

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO DE ALDICARBE E CARBOFURANO EM
AMOSTRAS DE CAFÉ BEBIDA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 09 de fevereiro de 2010

Prof. Efraim Lázaro Reis

Washington Xavier de Paula

Prof. Antônio Augusto Neves
(Co-orientador)

Prof. Laércio Zambolim
(Co-orientador)

Prof^a. Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz
(Orientadora)

À Deus,
Aos meus pais, Artulino e Madalena,
Ao meu irmão Emílio,
Ao Hideraldo,
Aos meus avós, Artulino e Dinair,
A meus tios e primos,

Com amor,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por minha vida e por guiar meus passos sempre;

Aos meus pais, pelo carinho, apoio, compreensão, amor incondicional. Obrigada, jamais esquecerei tudo que sempre fizeram, sem medir esforços, para que eu estivesse hoje onde estou;

Ao meu irmão Emílio, por sempre torcer por mim;

A minha família, avós, tios e primos por sempre torcerem por mim, e pelo apoio;

Ao Hideraldo, pelo carinho, compreensão, paciência, apoio e pela presença em todos os momentos.

A minha orientadora, professora Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade, tempo dedicado, por todos os ensinamentos, por toda a confiança e amizade durante estes anos de convivência. Enfim, obrigada por tudo.

Ao meu co-orientador, professor Antônio Augusto Neves, por sua imensa disponibilidade em me ajudar, ensinar e guiar. Muito obrigada por sua amizade e compreensão sempre.

Às colegas e amigas, Elenice e Simone, obrigada por terem guiado os meus primeiros passos dentro do nosso laboratório, por sempre transmitirem otimismo e alegria, pela valiosa contribuição neste trabalho, e por terem incentivado e acreditado em mim desde a graduação, quando eram minhas excelentes professoras.

A todos os amigos do Laboratório de Química Analítica – LAQUA, ou melhor, família LAQUA: Alessandra, Anna Isabel, Elenice, Elisa, Erick, Flaviane, Fernanda, Guilherme, Lidiane, Luiz Manoel, Ricardo, Rose, Simone, Tamires, Adriana, Bárbara, Laércio, Mateus, Luciana, Lívia, Armanda, Juliana, Maria Antônia, Ana Cláudia, Ana Luiza, Elizete e José Humberto. Obrigada pelo companheirismo, amizade, sorrisos, alegrias, choros, pela paciência e

pela maravilhosa convivência; A vocês amigas, que me acolheram em suas casas muitas vezes, o meu agradecimento especial, adoro vocês!

À Cláudia e Iara, que mesmo estando por pouco tempo em nosso laboratório já são mais que colegas, obrigada pelas palavras de apoio.

À amiga do coração Elizabeth, sempre me apoiando e incentivando desde os tempos da graduação, obrigada por sempre estar ao meu lado.

À amiga Elaine Marçal, por incentivar e apoiar essa grande conquista.

À amiga Luana Maro, obrigada por tudo, pelo companheirismo nos momentos bons e ruins, pelos conselhos, sugestões e por torcer por mim.

Às colegas de república, Alyne, Camila, Jack, Kelem, Luana e Naiara, obrigada pela amizade e também por me aguentarem nos momentos de ansiedade.

Ao professor Luciano Virtuoso, obrigada pelos ensinamentos valiosos e pela amizade.

Ao professor Per Christian Braaten que desde a graduação em Muriaé, incentivou essa conquista, obrigada pelos ensinamentos valiosos e brilhantes e também pela amizade.

À professora Amaziles Ferreira que desde o Ensino Médio, em suas brilhantes aulas de Química, soube despertar e incentivar o interesse por essa Ciência tão maravilhosa.

Aos Professores Antônio Alberto e Laércio Zambolim, por todo o suporte técnico na realização do projeto, colaborando de maneira indispensável com este trabalho.

Aos professores Efraim Lázaro Reis e Washington Xavier de Paula por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

Aos técnicos, Ricardo (LAQUA – DEQ/UFV), Zé Luis (LASA - DEQ/UFV), Francisco e Marcos (Fruticultura – DFT/UFV) pela colaboração e auxílio em minhas análises.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Química, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Criminalística de Minas Gerais;

Meus agradecimentos aos amigos e pessoas que de uma forma ou de outra auxiliaram para a realização deste trabalho e que com pesar não mencionei nesses agradecimentos seletivos.

BIOGRAFIA

RENATA DOMINGOS ALVES, filha de Artulino Alves Sobrinho e Maria Madalena Domingos Alves, nasceu em Manhuaçu, Minas Gerais, em 10 de abril de 1982.

Em fevereiro de 2001, iniciou o Curso de Graduação em Ciências, pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras Santa Marcelina, diplomando-se como licenciada em Química em dezembro de 2004.

Em janeiro de 2005, após aprovação em concurso público, foi nomeada professora efetiva do Estado de Minas Gerais, iniciando as atividades nesse mesmo ano.

Em março de 2008, iniciou o curso de pós-graduação em Agroquímica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2010.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	7
2.1. OBJETIVO GERAL	7
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
3.1. A CAFEICULTURA	9
3.2. ALDICARBE E CARBOFURANO	17
3.3. INTOXICAÇÕES	23
3.4. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE.....	26
3.5. VALIDAÇÃO.....	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1. SOLVENTES, REAGENTES E EQUIPAMENTOS	45
4.2. PRINCÍPIOS ATIVOS.....	46
4.2.1. Preparo de soluções padrão	46
4.3. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	47
4.4. AMOSTRAS	47
4.4.1. Preparo do café bebida	47
4.4.2. Fortificação do café bebida	48

4.5. OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA (ELL-PBT)	48
4.5.1. Testes preliminares	48
4.5.2. Otimização univariada	50
4.5.2.1. Modo e tempo de agitação	50
4.5.2.2. Solvente extrator	51
4.5.2.3. Tempo de fortificação	51
4.5.2.4. Efeito do pH da amostra	51
4.5.2.5. Força iônica	52
4.5.3. Planejamento fatorial 2 ²	52
4.6. EFICIÊNCIA DA ETAPA DE <i>CLEAN-UP</i> DOS EXTRATOS DE CAFÉ BEBIDA NA ELL-PBT	53
4.6.1. <i>Clean-up</i> com carvão ativado e florisil	53
4.6.2. Extração em fase sólida	54
4.6.3. <i>Clean-up</i> em cartuchos de florisil, sílica e carvão ativado	54
4.6.4. Permeação em gel	54
4.6.5. Soluções clarificadoras: Reagente de Carrez	55
4.7. COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	56
4.8. VALIDAÇÃO	57
4.8.1. Seletividade	57
4.8.2. Linearidade de resposta do detector	57
4.8.3. Limite de detecção e limite de quantificação do equipamento	58
4.8.4. Linearidade do método e faixa de trabalho	58
4.8.5. Limite de detecção e quantificação do método	58
4.8.6. Precisão	59
4.9. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ	59
4.10. APLICAÇÃO DA METODOLOGIA OTIMIZADA EM DIFERENTES AMOSTRAS DE CAFÉ BEBIDA	59
4.10.1. Influência da presença de açúcar e adoçante na determinação dos agrotóxicos	60
4.10.2. Influência da temperatura do café bebida durante a fortificação na eficiência de extração de aldicarbe e carbofurano ...	60
4.10.3. Influência do preparo da bebida de café sobre os níveis de agrotóxicos	61

4.10.4. Avaliação da estabilidade dos produtos comerciais em café bebida	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	64
5.2. OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA (ELL-PBT)	65
5.2.1. Testes preliminares	66
5.2.2. Otimização univariada	69
5.2.2.1. Modo e tempo de agitação	69
5.2.2.2. Solvente extrator	71
5.2.2.3. Tempo de fortificação	73
5.2.2.4. Efeito do pH da amostra	74
5.2.2.5. Força iônica	76
5.2.3. Planejamento fatorial 2 ²	77
5.3. METODOLOGIA OTIMIZADA	80
5.4. EFICIÊNCIA DA ETAPA DE <i>CLEAN-UP</i> DOS EXTRATOS DE CAFÉ BEBIDA NA ELL-PBT	80
5.4.1. <i>Clean-up</i> com carvão ativado e florisil	81
5.4.2. Extração em fase sólida	82
5.4.3. <i>Clean-up</i> em cartuchos de florisil, sílica e carvão ativado	83
5.4.4. Permeação em gel	85
5.4.5. Soluções clarificadoras: Reagente de Carrez	87
5.5. COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE PARTIÇÃO LÍQUIDO- LÍQUIDO.....	88
5.6. VALIDAÇÃO	89
5.6.1. Seletividade	89
5.6.2. Linearidade de resposta do detector	90
5.6.3. Limite de detecção e limite de quantificação do equipamento	92
5.6.4. Linearidade do método e faixa de trabalho	93
5.6.5. Limite de detecção e quantificação do método	94
5.6.6. Precisão	95
5.7. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ	96
5.8. APLICAÇÃO DA METODOLOGIA	100

5.8.1. Influência da presença de açúcar e adoçante na determinação dos agrotóxicos	100
5.8.2. Influência da temperatura do café bebida durante a fortificação na eficiência de extração de aldicarbe e carbofurano ...	101
5.8.3. Influência do processamento de café bebida na análise de resíduos de aldicarbe e carbofurano	103
5.8.4. Avaliação da estabilidade dos produtos comerciais em café bebida	105
6. CONCLUSÕES	111
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

LISTA DE TABELAS

	Tabela	Pág
Tabela 1.	Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos selecionados para estudo.	18
Tabela 2.	Modo e tempo de agitação da mistura amostra:acetonitrila.	50
Tabela 3.	Planejamento fatorial 2 ² para as amostras de café bebida fortificadas com aldicarbe e carbofurano (10,0 mg L ⁻¹).	53
Tabela 4.	Porcentagens de recuperação média e o desvio padrão associado às respostas, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de café bebida.	78
Tabela 5.	Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (\pm estimativa do erro experimental) na extração de cada um dos agrotóxicos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de café bebida.	79
Tabela 6.	Porcentagens de recuperação (%R), desvio-padrão (s) e coeficiente de variação (CV) de cada método de partição.	89
Tabela 7.	Limites de detecção (LD) e Limites de quantificação (LQ) do aparelho.	92
Tabela 8.	Limites de detecção (LD) e Limites de quantificação (LQ) do método.	95
Tabela 9.	Porcentagens de recuperação (%R), desvio-padrão (s) e coeficiente de variação (CV) após sete extrações dos agrotóxicos em café bebida (10,0 mg L ⁻¹).	96

Tabela 10.	Razão entre os coeficientes angulares e razão entre os coeficientes lineares das curvas analíticas em extrato da matriz e em solvente puro para aldicarbe e carbofurano em café bebida.	98
Tabela 11.	Grau do efeito de matriz para aldicarbe e carbofurano em café bebida (10,0 mg L ⁻¹).	99

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Cigarra do cafeeiro.	13
Figura 2. Lesão causada pelo bicho mineiro onde se observa no centro a larva do inseto.	14
Figura 3. Galha de nematoide do gênero <i>Meloidogyne</i> contendo massa de ovos em seu interior.	15
Figura 4. Cochonilha da raiz.	16
Figura 5. Fórmula estrutural: (a) ácido carbâmico; (b) geral de carbamato.	17
Figura 6. Cromatograma de (a) uma solução padrão a 5,0 mg L ⁻¹ contendo os agrotóxicos em acetonitrila; (b) amostra fortificada a 10,0 mg L ⁻¹ e submetida a ELL-PBT, onde: t _R = 7,9 min: aldicarbe e t _R = 13,5 min: carbofurano.	65
Figura 7. Porcentagem de extração do aldicarbe usando a técnica ELL-PBT em amostra de café bebida variando o tempo de partição em baixa temperatura.	67
Figura 8. Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano em função da quantidade de amostra e solvente extrator (acetonitrila).	68
Figura 9. Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano em café bebida utilizando diferentes modo e tempo de agitação. (US) agitação em banho ultrassônico; (AM) agitação mecânica em mesa agitadora.	70
Figura 10. Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano em café bebida utilizando diferentes solventes extratores.	72
Figura 11. Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano de amostras de café bebida fortificadas com os agrotóxicos	73

	em função do tempo de contato com a matriz.	
Figura 12.	Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano em café bebida em diferentes valores de pH da amostra.	75
Figura 13.	Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano em amostras de café bebida fortificadas com os agrotóxicos em função da força iônica utilizada.	76
Figura 14.	Diagrama para interpretação dos resultados significativos do planejamento fatorial 2 ² para o aldicarbe. Os valores nos vértices do quadrado são as respostas médias (rendimentos percentuais).	79
Figura 15.	Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano após ELL-PBT e <i>clean-up</i> com florisil e carvão ativado.	82
Figura 16.	Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano após ELL-PBT e <i>clean-up</i> por extração em fase sólida.	83
Figura 17.	Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano em amostras de café bebida após ELL-PBT e <i>clean-up</i> em cartuchos de sílica, florisil e carvão ativado (melhorar).	84
Figura 18.	Comparação de cromatogramas de extratos de café obtidos por ELL-PBT e submetidos ao <i>clean-up</i> .	85
Figura 19.	Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano após ELL-PBT e <i>clean-up</i> por permeação em gel.	86
Figura 20.	Comparação de cromatogramas de extratos de café obtidos por ELL-PBT e submetidos à permeação em gel.	86
Figura 21.	Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano obtidos após o teste de clarificação com reagentes de Carrez.	87
Figura 22.	Cromatograma de extrato obtido de café bebida (a) isenta dos princípios ativos; (b) contendo os princípios ativos a 10,0 mg L ⁻¹ .	90
Figura 23.	Curva analítica preparada partir de soluções padrão de aldicarbe e carbofurano na faixa de concentração entre 0,025 e 250,0 mg L ⁻¹ analisadas por CLAE-UV.	91
Figura 24.	Curva analítica preparada a partir de extratos de café bebida fortificados com padrão de aldicarbe e carbofurano na faixa de concentração entre 0,025 e 250,0 mg L ⁻¹	93

	analisados por CLAE-UV.	
Figura 25.	Curva analítica preparada a partir de extratos de café bebida fortificados com padrão de aldicarbe e carbofurano na faixa de concentração entre 0,10 e 25,0 mg L ⁻¹ analisados por CLAE-UV.	94
Figura 26.	Curvas analíticas preparadas em acetonitrila e branco da matriz: (a) aldicarbe; (b) carbofurano.	98
Figura 27.	Influência da presença de açúcar e adoçante na determinação de aldicarbe e carbofurano em café bebida.	101
Figura 28.	Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano em amostra de café bebida fortificadas em diferentes temperaturas.	102
Figura 29.	Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano em amostras de café bebida fortificadas antes do preparo da bebida e após o preparo da bebida.	104
Figura 30.	Influência do preparo da bebida determinação de aldicarbe e carbofurano em café bebida e em borra de café.	105
Figura 31.	Efeito da luz e do açúcar na degradação dos carbamatos em café bebida a 22 °C: (a) amostras sem açúcar e em ausência de luz; (b) amostras sem açúcar e em presença de luz; (c) amostras com açúcar e em ausência de luz; (d) amostras com açúcar e em presença de luz.	107
Figura 32.	Efeito do açúcar e da temperatura de armazenamento das amostras na degradação dos carbamatos em café bebida: (a) amostras sem açúcar a 4 °C; (b) amostras com açúcar a 4 °C; (c) amostras sem açúcar a – 20 °C; (d) amostras com açúcar a – 20 °C.	108

RESUMO

ALVES, Renata Domingos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010.
Otimização e validação de metodologia para determinação de aldicarbe e carbofurano em amostras de café bebida. Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-orientadores: Antônio Augusto Neves e Laércio Zambolim.

O emprego doméstico de aldicarbe e carbofurano tem acarretado envenenamento acidental ou intencional, tornando-se um grave problema de saúde pública. A mistura do chumbinho em café (pó e bebida) é uma alternativa frequente de envenenamento em função do forte odor e cor do café que disfarçam a presença do chumbinho. Assim, o objetivo desse trabalho foi adaptar, otimizar e validar a técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para determinação de aldicarbe e carbofurano em café bebida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) visando a disponibilização da técnica para elucidação de casos de interesse forense e agrário. Testes preliminares foram realizados na otimização do método para avaliação de variáveis na extração dos agrotóxicos como: solvente extrator, volume de amostra e de solvente extrator, pH da amostra, força iônica, modo de homogeneização e tempos de agitação, de fortificação e de partição. Posteriormente, um planejamento fatorial completo 2^2 , foi realizado para avaliação do comportamento simultâneo da concentração de NaCl na amostra (0% ou 3% m/v) e do pH da amostra (3,0 ou 5,5) na eficiência de extração dos carbamatos. O método otimizado consiste em acrescentar a 2,0 mL do café bebida (8% m/v), 4,0 mL de acetonitrila, verificando-se a formação de fase única. Essa mistura é então, agitada em mesa agitadora (5 minutos) e levada ao freezer à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 horas. Nestas condições as fases são separadas e o extrato orgânico, contendo os princípios ativos são recuperados e analisados por CLAE, empregando água e acetonitrila como fase móvel (65:35). A técnica otimizada foi validada, determinando as principais figuras de mérito, tais como: seletividade, limites de

detecção e de quantificação e linearidade. Avaliou-se também o efeito de matriz na quantificação desses princípios ativos por CLAE. Os resultados indicam que o método de ELL-PBT é eficiente para a extração dos dois agrotóxicos em amostras de café bebida, mostrando porcentagens de recuperação maiores que 94%. Os limites de detecção e quantificação do método foram 0,54 e 1,80 mg L⁻¹ respectivamente, para o aldicarbe e 0,28 e 0,92 mg L⁻¹ para o carbofurano. O efeito da matriz mostrou-se presente na quantificação dos agrotóxicos por cromatografia líquida. No estudo da estabilidade desses princípios ativos, observou-se que dos três fatores analisados, a temperatura de armazenamento das amostras foi o fator que mais afetou a degradação dos carbamatos. À temperatura ambiente, observou-se após 5 dias o crescimento de fungos e também maior degradação dos compostos. Logo, a otimização da ELL-PBT para extração de resíduos de agrotóxicos em amostras de café bebida e análise por CLAE resultou em um método simples, eficaz, com pequeno consumo de solvente, alta frequência analítica e baixo custo.

ABSTRACT

Alves, Renata Domingos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010.
Optimization and validation of methodology for determination of aldicarb and carbofuran in coffee samples. Advisor: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.
Co-advisors: Antônio Augusto Neves and Laércio Zambolim.

Domestic use of aldicarb and carbofuran has resulted in accidental or even intentional poisonings, making it a severe public health problem. A mixture of “chumbinho” (aldicarb) in coffee is frequently a poisoning agent due to strong odor and color of coffee which hide the presence of “chumbinho”. Thus, the objective of this study was to adapt, optimize and validate a liquid-liquid extraction technique with low temperature partitioning (LLE-LTP) for determination of aldicarb and carbofuran in coffee by high performance liquid chromatography (HPLC-UV), aiming to make the technique available for poisoning cases of forensic and agrarian interest. Preliminary tests were performed on optimization of the method for the evaluation of variables from extraction of pesticides such as: solvent extractor, volume of the sample and solvent extractor, pH of the sample, ionic force, homogenization mode and times of agitation, fortification and partitioning. Later, a complete 2^2 factorial scheme was used for evaluation of the simultaneous behavior of NaCl concentration in the sample (0% or 3% w/v) and pH of the sample (3.0 or 5.5) on extraction efficiency of the carbamates. The optimized method consisted of adding 2.0 mL of the coffee sample (8% w/v) and 4.0 mL of acetonitrile, verifying the formation of a single phase. This mixture is then agitated on a table agitator (5 minutes) and placed in a freezer at -20°C for 3 hours. Under these conditions the phases are separated and the organic extract which contains the active principles which is recovered and analyzed by HPLC, employing water and acetonitrile as the mobile phase (65:35). The optimized technique was validated, determining the principle figures of merit, including: selectivity, detection and quantification limits and linearity. Effect of the matrix on

quantification of these active principles by HPLC was also evaluated. The results indicated that the LLE-LTP method is efficient for extraction of the two pesticides in coffee samples, showing recovery percentages greater than 94%. Detection and quantification limits of the method were 0.54 and 1.80 mg L⁻¹ respectively for aldicarb and 0.28 and 0.92 mg L⁻¹ for carbofuran. The effect of the matrix showed to be present on quantification of the pesticides by liquid chromatography. In the study of the stability of these active principles, it was observed that of the three factors analyzed, storage temperature of the samples was the factor that most affected degradation of the carbamates. At room temperature, fungi growth as well as greater degradation of the composts was observed after 5 days. Therefore, optimization of the LLE-LTP method for extraction of pesticide residues from coffee samples and analysis by HPLC resulted in a simple and effective method, with little consumption of solvent, high analytical frequency and low cost.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, quando o homem iniciou as primeiras atividades agrícolas cultivando plantas de uma mesma espécie ao seu redor, surgiram também, as pragas e doenças. A preocupação com seu controle é, portanto, um problema tão velho quanto a agricultura.

Segundo Vaz et al. (1996), os primeiros esforços para controlar quimicamente as pestes se deram pelo uso de substâncias tóxicas de ocorrências naturais como mercúrio, enxofre e extratos de plantas como nicotina e piretro. A era dos modernos pesticidas sintéticos se iniciou em 1939, com a descoberta das propriedades inseticidas do DDT. Os agrotóxicos têm hoje uma utilização bastante ampla, incluindo herbicidas, inseticidas, acaricidas, nematocidas, raticidas, fungicidas, bactericidas, reguladores de crescimento, desfolhantes, dessecantes e feromônios.

Basicamente, os agrotóxicos são usados na agricultura com três objetivos: manter o potencial produtivo das culturas, melhorar a aparência dos produtos e reduzir o trabalho e os gastos com energia. Sem dúvida, esses objetivos foram alcançados nessas últimas décadas.

Toda a experiência acumulada nesses anos de uso intensivo de agrotóxicos trouxe por um lado um relativo controle das pragas com efeito na produtividade e por outro, muita preocupação. O uso indiscriminado, sem critérios e sem conhecimento aprofundado de sua ação e efeitos, trouxe e está trazendo problemas sério à saúde do homem e contaminação do meio ambiente e, conseqüentemente, à qualidade de vida do ser humano.

O Brasil aparece no mercado mundial como o 3º maior consumidor de agrotóxicos de modo geral, movimentando em torno de US\$ 3,9 bilhões em 2006 (YAMASHITA, 2008). De todo esse agrotóxico comercializado, cerca de 50% é destinado à produção de soja, sendo o país o segundo maior produtor

mundial desse grão e o único com capacidade de aumentar a área cultivada (YAMASHITA, 2008).

Os N-metilcarbamatos foram introduzidos no mercado no início dos anos 60. Desde então, tornaram-se os agrotóxicos mais utilizados no mundo como substitutos dos compostos organoclorados por causa da elevada eficiência como inseticida e nematicida e do baixo potencial de bioacumulação (ABAD et al., 1999).

Embora os agrotóxicos sejam benéficos para a proteção de plantas contra doenças e pragas, o transporte desses produtos pela água, em regiões não exploradas pelo sistema radicular, não somente os tornam indisponíveis às plantas, mas também, podem alterar drasticamente a qualidade da água dos aquíferos subterrâneos, os quais são bastante explorados pelo homem, uma vez que se constituem em importante fonte de água limpa para a humanidade (CORREA et al., 1999).

No Brasil faltam, infelizmente, dados que indiquem o grau de poluição das águas subterrâneas provocado pelos agrotóxicos. No entanto, o inseticida, acaricida e nematicida sistêmico aldicarbe e seus produtos de oxidação, sulfóxido e sulfona de aldicarbe, têm sido detectados em fontes de abastecimento de água localizadas próximo a cultivos de batata (RIGITANO e GOUVEIA, 1995). Atenção especial deve ser creditada a esses produtos de oxidação que, além de apresentarem atividade como agrotóxico, são tóxicos ao homem. Estes compostos são rapidamente lixiviados no solo, sendo as formas predominantes após algumas semanas da aplicação do produto comercial (CORREA et al., 1999).

O carbofurano, que também pertence à classe dos N-metilcarbamatos, assim como o aldicarbe, devido a sua ampla utilização na agricultura e relativa solubilidade em água, pode contaminar águas superficiais e subterrâneas. Brkic' et al. (2008) relataram que o carbofurano tem sido frequentemente detectado como contaminante das águas subterrâneas na América, bem como na Europa e na Ásia ao longo das últimas duas décadas.

Além de extensos casos notificando a contaminação de águas subterrâneas e superficiais (CARBO et al., 2008; GARCÍA de LLASERA e BERNAL-GONZÁLEZ, 2001; PARREIRA et al., 2001) e alimentos (frutas, verduras, carnes e produtos industrializados (NUNES et al., 2006; TOTTI et al., 2006; BORKOVCOVÁ et al., 2004; NUNES et al., 2000), muitos relatos de

mortes e intoxicações individuais e coletivas foram e têm sido frequentes (AZEREDO et al., 2005; CHRISMAN, et al., 2005; MARTINS et al., 2005; PROENÇA et al., 2004; MORAES, 1999).

De 1985 a 2006 foram registrados pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX, 2008) 192.308 casos de intoxicação humana, incluindo agrotóxicos de uso agrícola, domissanitários, produtos veterinários e raticidas.

Como se sabe, no Brasil apesar dos esforços no controle da comercialização e do uso de agrotóxicos, por entidades públicas e privadas tem sido constatado aumento no número de envenenamentos, os quais podem ser intencionais ou não.

Dentre os agrotóxicos de uso restrito à agricultura, o aldicarbe tem se configurado como um grave problema de saúde pública devido aos casos de morte e intoxicação registrados. Somente em 2003, foram registrados 122 casos de morte devido intoxicação por aldicarbe no estado do Rio de Janeiro, sem considerar os outros estados e os casos não registrados (CHRISMAN et al., 2005).

O aldicarbe é vendido no comércio informal como raticida, sob denominação de chumbinho, e é considerado como um dos carbamatos mais tóxicos disponíveis (AZEREDO et al., 2005; RAGOUCY-SEGLER et al., 2000).

A mistura do chumbinho em café (pó e bebida) é uma alternativa frequente de envenenamento em função do forte odor e cor do café que disfarçam a sua presença. Taga e Oliveira (2006) relataram um caso de envenenamento em virtude do uso ilegal desse agrotóxico no Brasil, em amostra de café bebida. Nesse trabalho, foram analisadas amostras de café torrado e moído, e de café bebida originadas da Secretaria de Segurança Pública de São Paulo (SSP-SP). Foi constatada em uma amostra de café bebida a presença de aldicarbe, comprovando assim o envenenamento.

Os principais métodos de análise de resíduos de agrotóxicos são os cromatográficos, destacando-se a cromatografia gasosa e a líquida. Tais métodos são precisos, sensíveis, seletivos, permitindo a análise simultânea de vários compostos. O desenvolvimento de métodos, para determinação de resíduos de aldicarbe e carbofurano realizado neste trabalho, pode auxiliar

duas grandes áreas da química que têm interesses comuns: a química analítica aplicada à agropecuária e a química forense.

A química forense aplica a química na investigação de crimes, estuda os fatos de interesse legal como casos de envenenamento, homicídios, suicídios, intoxicações agudas, etc. A química analítica aplicada à agropecuária, por sua vez, desenvolve métodos com o objetivo de monitorar eventuais resíduos de compostos nocivos presentes no ambiente e em alimentos.

Tendo em vista tudo o que foi apresentado, pode-se perceber que vêm aumentando cada vez mais os problemas de interesses forense e agrícola. Assim, neste trabalho procurou-se desenvolver uma metodologia para determinação de aldicarbe e carbofurano em amostras de café bebida utilizando a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) e análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta (CLAE-UV).

Com este estudo pretende-se dar suporte técnico aos Institutos de Criminalística da Polícia Civil na análise de amostras de café com suspeita de envenenamento por chumbinho. Pretende-se também avaliar a melhor forma de conservação e armazenamento dessas amostras, bem como avaliar a qualidade do café consumido no Estado, uma vez que aldicarbe e carbofurano também são utilizados na cultura de café para controle de insetos-pragas e nematoides.

Sendo o café bebida ma matriz muito complexa, constituída de muitos compostos voláteis e semi-voláteis que interferem na análise de aldicarbe e carbofurano, há necessidade do preparo de amostras. A ELL-PBT tem-se mostrado uma técnica propícia para isso, já que em uma única etapa realiza a extração e clean up das amostras, é simples, rápida e de baixo custo.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Adaptar a técnica de ELL-PBT para determinação de resíduos de agrotóxicos aldicarbe e carbofurano em amostras de café bebida por CLAE-UV.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Otimizar e validar a técnica de ELL-PBT para determinação de resíduos dos agrotóxicos aldicarbe e carbofurano em amostras de café bebida por cromatografia líquida de alta eficiência.

2.2.2. Estabelecer condições ótimas de separação, identificação e quantificação simultânea dos carbamatos.

2.2.3. Avaliar o efeito da adição de açúcar e adoçante na determinação destes princípios ativos em café bebida.

2.2.4. Comparar a eficiência da extração de aldicarbe e carbofurano de café bebida preparada com amostras de pó de café fortificadas com os valores obtidos a partir da extração de amostras de café bebida fortificadas, na mesma concentração.

2.2.5. Avaliar a estabilidade dos produtos comerciais (Temik e Furadan) nessa matriz, em diferentes temperaturas, com e sem açúcar e em presença/ausência de luz em função do tempo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A CAFEICULTURA

O café (*Coffea*) planta perene de porte arbustivo pertence a família Rubiaceae, produtora de frutos tipo baga, encerrando, normalmente, duas sementes que representa o seu produto econômico. Estas depois de convenientemente processadas são consumidas na forma de infusão. A bebida é nutritiva e estimulante, com aroma e sabor característicos (SILVA, 2004), sendo seu consumo disseminado pelo mundo.

São conhecidas mais de 100 espécies do gênero *Coffea*, sendo as mais importantes *Coffea arábica* L. e *Coffea canephora* Pierre, café arábica e café conilon, respectivamente (RIBEIRO et al., 2009; CAIXETA et al., 2007; ALVES et al., 2006; ZAMBOLIM et al., 2005; MARTÍN et al., 1999). O café arábica produz uma bebida de café mais fino, que apresenta bebida de qualidade superior, com maior aroma e sabor (RIBEIRO et al., 2009; CAIXETA et al., 2007; MARTÍN et al., 1999). O café conilon é adicionado ao café arábica para acentuar o sabor e o corpo da bebida e na preparação de café solúvel (MORAIS et al., 2009).

A matriz café é extremamente complexa e seu processamento (torrefação) dá origem a uma grande quantidade de compostos voláteis responsáveis pelo aroma desse produto. Assim, o café processado contém mais compostos voláteis do que qualquer outro alimento ou bebida (aproximadamente mil compostos voláteis já foram identificados nesse produto) os quais são associados ao *flavor* e aroma do café. O estudo dessas substâncias voláteis é extremamente complexo e seu desenvolvimento vem ocorrendo de modo lento e contínuo (BANDEIRA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2009; ZAMBONIN et al., 2005; MOREIRA et al., 2000). Zambonin et al. (2005)

citam que os principais compostos químicos encontrados no café verde responsáveis pela formação de compostos voláteis no café torrado são: alcalóides, trigonelina, ácidos clorogênicos, carboidratos lipídeos, proteínas e açúcares livres como sacarose.

As bebidas de café são feitas de grãos de café torrados, arábica e robusta ou misturas (*blends*) desses dois (Zambonin et al., 2005; MARTÍN et al., 1999).

Vale ressaltar que, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a vários detectores, principalmente o ultravioleta, tem sido muito utilizada (ALVES et al., 2009; MORAIS et al., 2009; ALVES et al., 2006; MONTEIRO e TRUGO, 2005; DE MARIA e MOREIRA, 2004; NOGUEIRA e TRUGO, 2003) na identificação e quantificação de compostos que discriminam, caracterizam grãos de café arábica e robusta. Além disso, tem sido utilizado também para identificação de compostos que contribuem para a qualidade e funcionalidade do café.

O café é uma importante *commodity* no mercado mundial de produtos agrícolas. É o segundo maior gerador de riquezas do planeta, perdendo apenas para o petróleo (BANDEIRA et al., 2009; CAMPOS, 2005; MOREIRA et al., 2000). Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de café, sendo responsável por 30% do mercado internacional, volume equivalente à soma da produção dos outros seis maiores países produtores. Em 2007 produziu 33,4 milhões de sacas. É o maior exportador do mundo, com 28,1 milhões de sacas embarcadas em 2007 (ABIC, 2009). A terceira estimativa de produção total de café (arábica e conilon), para a safra 2009, indica que o país deverá colher 39,0 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado. O resultado dessa pesquisa representa uma redução de 15,20% quando comparada com a produção de 46,0 milhões de sacas obtidas na temporada anterior (CONAB, 2009).

A produção do café arábica representa 72,81% (28,4 milhões de sacas de café beneficiado) da produção do País, e tem como maior produtor o Estado de Minas Gerais, com 68,08% do total do ciclo 2008/09. Levando-se em conta apenas a variedade arábica, o Estado foi responsável por 66,4% (18,97 milhões de sacas de café beneficiado). Já o Espírito Santo está na vice-liderança, com 22,2% do volume. Maior produtor de conilon, o Estado fechou o ano com 70% do montante desse tipo específico de café (CONAB, 2009).

O Brasil é também o segundo maior mercado consumidor mundial, com a marca de 17 milhões de sacas em 2007, atrás somente dos Estados Unidos (ANUÁRIO Brasileiro do Café, 2009).

O nível tecnológico no sistema agroindustrial do café no Brasil aumentou na última década e junto com ele cresceram as exigências dos consumidores no mercado mundial de café, à procura de alimentos sadios e isentos de resíduos de agroquímicos prejudiciais à saúde (PEREIRA et al., 2007).

Em junho, o Japão informou que foi detectada a presença de resíduo de piraclostrobina em lotes de contêineres de café importado do Brasil em níveis acima do permitido pela legislação daquele país. Embora, o comércio não tenha sido interrompido (AGÊNCIA ESTADO, 2009), percebe-se a necessidade de um controle mais rigoroso no que tange a qualidade café, seja ele bebida, grão cru (verde) ou torrado e moído.

Segundo Portocarrero e Kososki (2007), é necessário também harmonizar as exigências internacionais para estas questões e utilizar, também os conceitos e regras estabelecidas pelo *Codex Alimentarius*, para que diminua o total de notificações advindas da Europa e dos Estados Unidos sobre o limite máximo de resíduos (LMR) de agroquímicos utilizados em produtos agropecuários.

Estas exigências podem ser atendidas com a adoção dos programas de certificação que apresentam foco na rastreabilidade (PEREIRA et al., 2007), um sistema de identificação que permite resgatar a origem e a história do produto, da produção ao consumo. Portanto, garante segurança e conforto aos consumidores e aos envolvidos no processo (PORTOCARRERO, 2007).

A rastreabilidade consiste em um conjunto de práticas passíveis de adoção por diversos setores da economia, para disponibilizar todas as informações essenciais sobre seus produtos, desde as matérias-primas utilizadas na sua elaboração, passando pelo transporte, até o momento em que os produtos são vendidos ou chegam ao consumidor final (PEREIRA et al., 2007). Na cafeicultura, a rastreabilidade é um tema que começou a ser discutido há pouco tempo na esfera de produção, e ocorre, principalmente, devido às exigências dos consumidores e demais atores do sistema agroindustrial do café (PEREIRA et al., 2007).

Dentre os diversos aspectos envolvidos com o controle químico das doenças do cafeeiro, os itens mais importantes relacionados à rastreabilidade

são: os métodos empregados na aplicação dos agrotóxicos, as características dos mesmos, aplicação racional, a maquinaria, condições do meio ambiente e os critérios empregados na tomada de decisão para se realizar o controle (ZAMBOLIM et al., 2007).

A cultura do café caracteriza-se por utilizar muitos insumos agrícolas. Segundo Vieira (2005a) os agrotóxicos empregados na cultura do café se enquadram em três grandes grupos para o controle de insetos-pragas, doenças e plantas daninhas (inseticidas, fungicidas e herbicidas), sendo mais frequentemente utilizados o Tamaron (Metamidofós), Baysiston (Triadimenol e Dissulfotom), Round-up (Glifosato) e Dursban (Clorpirifós). Segundo a Anvisa (2010), o dissulfotom e o metamidofós possuem classificação toxicológica I (extremamente tóxicos), o clorpirifós e o triadimenol, classificação toxicológica II e o glifosato, classificação toxicológica IV.

Além desses agrotóxicos, outros de uso permitido e bastante difundido, principalmente entre os cafeicultores da região do Alto Paranaíba e Triângulo Mineiro, em Minas Gerais são o TEMIK e o FURADAN, (RIGITANO et al., 2001), cujos princípios ativos são o aldicarbe e o carbofurano, respectivamente. Tais produtos pertencem às classes dos inseticidas, nematicidas e acaricidas, apresentando elevada eficiência no controle a nematoides e também contra cigarras do cafeeiro, bicho mineiro e cochonilha verde.

O cafeeiro hospeda inúmeras espécies de insetos e ácaros, algumas das quais são pragas de importância econômica e frequentemente causam prejuízos, enquanto que outras não chegam a causar nenhum dano. Os principais insetos-pragas da cultura do café no estado de Minas Gerais, embora possa haver diferenças entre as regiões cafeeiras, de modo geral são: o bicho mineiro (*Leucoptera coffeella*); a broca do café (*Hypothenemus hampei*) e as cigarras do cafeeiro (*Quesada gigas*) (REIS e SOUZA, 1998). Cita-se ainda, a ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e a cercosporiose, ou mancha de olho pardo (*Cercospora coffeicola*).

Com relação à distribuição geográfica, o bicho mineiro é o inseto-praga de ocorrência generalizada no Estado, enquanto que, as cigarras têm atacado cafezais a noroeste da região Sul de Minas e em parte do Alto Paranaíba (REIS e SOUZA, 1998). Os nematoides (*M. exigua*, *M. incógnita* e *M. paranaensis*) encontram-se amplamente disseminados na cafeicultura

brasileira, mesmo nas regiões emergentes e promissoras, como o Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, em Minas Gerais (GONÇALVES et al., 1998) .

As cigarras são importantes insetos-pragas do cafeeiro, podendo causar prejuízos consideráveis às lavouras infestadas (SOUZA, 2004). A espécie mais comumente encontrada, *Quesada gigas*, é de grande importância para a cultura do café devido à sucção da seiva das raízes (figura 1). O seu ataque provoca grandes quedas na produção da lavoura (SIA, 2009). O controle deve visar as ninfas no solo. O gênero *Quesada* deve ser controlado, quando a população de ninfas/cova de cafeeiro for igual ou superior a 35. Este é feito com inseticidas granulados sistêmicos, à base de aldicarbe, carbofurano, dissulfotom, forato e terbufós (REIS e SOUZA, 1998).



Figura 1. Cigarra do cafeeiro.

Fonte: <www.nucleoestudo.ufla.br/necaf/lavour1.jpg>

Gonçalves e Faria (1989) avaliaram a eficiência dos inseticidas sistêmicos granulados aldicarbe 10%, carbofurano 5% e dissulfotom a 2,5 e 10%, em dois tipos de solo, no controle das ninfas móveis das cigarras do cafeeiro. Utilizaram-se doses desses inseticidas próximas às recomendadas para o controle do bicho mineiro, as quais proporcionaram uma redução média de 67,5 e 54,1% na população das ninfas móveis da praga, respectivamente, em solo arenoso e argiloso. E o controle dos insetos-praga após a aplicação de aldicarbe, carbofurano e dissulfotom propicionou que as plantas pudessem produzir 175, 227 e 246%, respectivamente. Almeida (2004) recomendou entre outros, o uso de carbofurano (Furadan 5 G) e aldicarbe (Temik 10 G) como controle das cigarras.

O bicho mineiro, *Leucoptera coffeella*, uma das pragas mais importantes da cafeicultura brasileira, pode provocar sérios prejuízos à produção, bem como redução no rendimento e na longevidade dos cafeeiros. Os danos são

ocasionados pela lagarta que, após a eclosão, penetra na folha destruindo o parênquima e diminuindo a capacidade fotossintética da planta (DIEZ-RODRIGUEZ et al., 2006). Infestações severas podem provocar elevados níveis de desfolha, fazendo com que as lavouras demorem até dois anos para se recuperarem. A Figura 2 ilustra o bicho mineiro em folha de cafeeiro.



Figura 2. Lesão causada pelo bicho mineiro onde se observa no centro a larva do inseto.

Fonte: <www.nucleoestudo.ufla.br/necaf/lavour2.jpg>

O controle do bicho mineiro tem sido realizado, principalmente, por meio da utilização de inseticidas: aldicarbe, carbofurano, dissulfotom e forato (REIS e SOUZA, 1998). A aplicação no solo, como é o caso dos granulados sistêmicos, destaca-se pela elevada eficiência, longo período residual e seletividade para predadores e parasitoides, sendo, desta forma, apropriados para a implementação de programas de manejo integrado de pragas (DIEZ-RODRIGUEZ et al., 2006). Esses mesmos autores verificaram a ocorrência dos metabólitos de aldicarbe em folhas de cafeeiro (correspondentes aos três terços das plantas) demonstrando a translocação do inseticida, desde as raízes até a parte aérea. O aldicarbe na maior dose estudada contribuiu para manter a infestação do bicho mineiro inferior à da testemunha, nas avaliações realizadas entre os 90 DAA (dias após aplicação) e 210 DAA. Carvalho et al. (2003) constataram que aldicarbe (Temik 150G) causou menor impacto sobre os parasitoides do bicho mineiro em relação aos demais inseticidas testados, sendo este recomendado em estratégias e táticas de controle desse inseto-praga chave do cafeeiro.

Dentre os diversos entraves à produtividade do cafeeiro, os nematoides são responsáveis por significativa redução na produção e, em alguns casos, até mesmo o abandono da atividade cafeeira. *M. exigua* tem ampla

disseminação nos cafezais brasileiros. O controle de nematoides do gênero *Meloidogyne* é, de modo geral, uma operação difícil de ser realizada e sua erradicação é praticamente impossível (ZAMBOLIM et al., 2007; ZAMBOLIM et al., 2005; GONÇALVES et al., 1998). Entretanto, esses parasitos podem, muitas vezes, ter sua população reduzida e mantida em níveis baixos através de integração de medidas de controle, ou seja, através do manejo integrado. O manejo químico dos fitonematoides em cafezais infestados tem sido realizado com nematicidas sistêmicos granulados, sendo mais comumente utilizados na cafeicultura: aldicarbe, carbofurano, terbufós (GONÇALVES et al., 1998), que atuam diminuindo o nível populacional desses parasitos por um determinado período; entretanto, após certo tempo a população do nematoide volta a multiplicar, necessitando de outra aplicação de nematicidas, atitude que passa a ser constante, gerando contaminação ambiental e aumento no custo de produção (ZAMBOLIM et al., 2007). A Figura 3 ilustra os nematoides das galhas em raízes de cafeeiro.

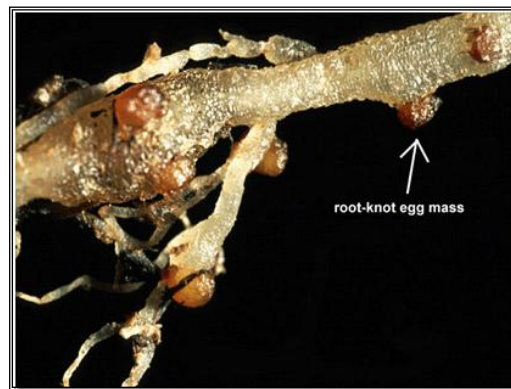


Figura 3. Galha de nematoide do gênero *Meloidogyne* contendo massa de ovos em seu interior.

Fonte: <www.nematoides.com.br>

A cochonilha da raiz do cafeeiro, *Dysmicoccus* sp., é um inseto sugador de seiva, que vive em colônias nas raízes do cafeeiro, Figura 4.



Figura 4. Cochonilha da raiz.

Fonte: <www.plantasonya.com.br/pragas-e-doencas/inseticidas-naturais-para-combater-cochonilhas.html>

As cochonilhas farinhentas são formadas por insetos em colônia, de coloração rosada, denominados de ninfas e adultos, revestidos por uma camada de secreção cerosa branca, que lhes dá o aspecto de haverem sido envolvidos em farinha. Nas raízes, ninfas e adultos da cochonilha sugam continuamente a seiva. Nessa fase, não causa prejuízos irreversíveis à planta, tampouco manifesta sintomas na parte aérea. Com o passar do tempo, o inseto vai tomando todo o sistema radicular do cafeeiro, resultando no comprometimento de suas raízes, não havendo mais absorção de água e nutrientes via solo. O controle químico da cochonilha da raiz é realizado por meio da aplicação de inseticidas sistêmicos granulados no solo: carbofurano 350 SC, com controle apenas parcial da cochonilha (SOUZA et al., 2001).

O uso de defensivos agrícolas para aplicação no solo tornou-se uma prática rotineira, tanto em cafeicultura do cerrado quanto em lavouras de montanha para o controle da ferrugem e do bicho mineiro. Nessas regiões, os defensivos são aplicados em caráter preventivo nos anos de alta carga da lavoura, devido ao grande potencial que a ferrugem e o bicho mineiro representam para a cultura (ZAMBOLIM et al., 2007).

Um estudo foi conduzido por Bastos et al. (2003) para avaliar o impacto do aldicarbe sobre a entomofauna no solo de cafezais. Verificou que o aldicarbe impactou a comunidade de artrópodes do solo de café, principalmente uma espécie de ácaro.

3.2. ALDICARBE E CARBOFURANO

Os carbamatos, que começaram a ser utilizados como inseticidas em 1951, derivam-se do ácido carbâmico, cuja fórmula é apresentada na Figura 5a. Um dos hidrogênios ligado ao nitrogênio encontra-se substituído por um grupo alquila (R'), normalmente metila, e o hidrogênio ligado ao oxigênio está substituído por um grupo orgânico mais longo e complexo, radical (R), Figura 5b (BAIRD, 2002). Aldicarbe e carbofurano pertencem ao grupo químico carbamato, ou melhor, metilcarbamato (ANVISA, 2009a).

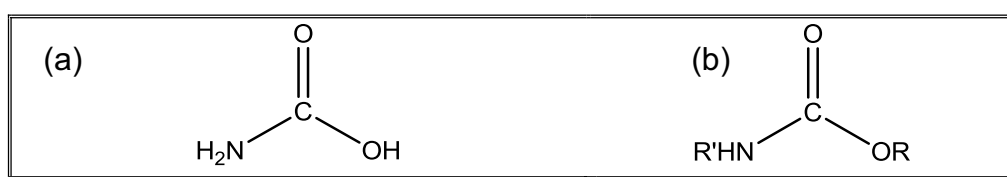


Figura 5. Fórmula estrutural (a) ácido carbâmico; (b) geral de carbamato.

Os carbamatos são similares aos organofosforados: apresentam uma meia-vida curta no meio ambiente. São inibidores reversíveis das colinesterases, porém as intoxicações podem ser igualmente graves (OPAS, 1997). A toxicidade dos carbamatos é influenciada pelo veículo e pela via de exposição. Uma vez absorvidos, os carbamatos são rapidamente distribuídos aos tecidos e órgãos. O metabolismo e a eliminação são relativamente rápidos, e não há evidências de haver bioacumulação dos carbamatos (PASSAGLI et al., 2009b).

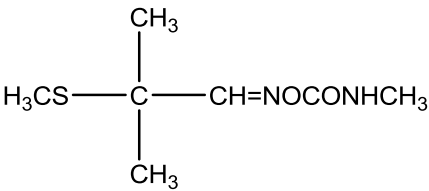
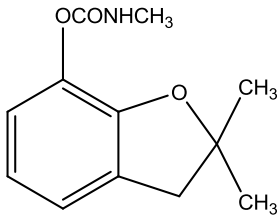
Estes agrotóxicos têm sido muito utilizados na agricultura para o controle de insetos-pragas devido à sua eficiência e rápida degradação no meio ambiente (PARREIRA et al., 2001). A degradação moderadamente rápida dos carbamatos contribui para que estes compostos não sofram problemas de bioacumulação nos organismos vivos e nem ao longo das cadeias alimentares como ocorre com os organoclorados (BOGIALLI et al., 2004). Por outro lado, os carbamatos são mais tóxicos que os organoclorados, podendo apresentar toxicidade aguda ao homem e mamíferos (BARON, 1994) e também a aves e peixes (BRKIĆ et al., 2008; PATRÍCIO et al., 2002). Estes compostos são instáveis em condições neutras e alcalinas, à temperatura ambiente (GALLI et al., 2006). Embora apresentem baixa persistência e tempos de meia vida curto,

sofrem oxidação rápida e produzem compostos que são tão tóxicos quanto os mesmos (PARREIRA et al.; 2001).

Aldicarbe, 2-metil-2-(metiltio)propionaldeído O-metilcarbamato de oxima, é um inseticida, acaricida e nematicida do grupo químico metilcarbamato de oxima, comercializado no país sob a forma exclusiva do agrotóxico Temik 150, da empresa Bayer Cropsscienes. Possui autorização de uso exclusivamente agrícola, em solo de culturas de algodão, batata, café, cana-de-açúcar, citros e feijão (ANVISA, 2010). Sua fórmula molecular é $C_7H_{14}N_2O_2S$, e as principais propriedades físico-químicas são apresentadas na Tabela 1.

Carbofurano, 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofurano-7-ilmetilcarbamato, é um inseticida, cupinicida, acaricida e nematicida do grupo químico metilcarbamato de benzofuranila, possui autorização de uso exclusivamente agrícola no solo para as culturas de algodão, amendoim, arroz, banana, café, cana-de-açúcar, cenoura, feijão, fumo, milho, repolho, tomate e trigo e em sementes de algodão, arroz, feijão, milho e trigo (ANVISA, 2010). Sua fórmula molecular é $C_{12}H_{15}NO_3$ e as principais propriedades físico-químicas são apresentadas na Tabela 1. É comercializado pela FMC Química do Brasil Ltda, com o nome de Furadan.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos selecionados para estudo.

Composto	Aldicarbe ^a	Carbofurano ^b
Massa molar (g mol ⁻¹)	190,25	221,25
Estrutura química		
Solubilidade em água (g L ⁻¹ , 20 °C)	6,0	0,7
Pressão de vapor (mPa)	13,0 (25 °C)	2,66 (33 °C)
Densidade relativa	1,19 (25 °C)	1,18 (20°C)
Coefficiente de partição octanol-água (logKow)	1,36	1,13

^a Obtido de WHO (1991);

^b Obtido de WHO (2008);

Segundo a ANVISA (2009a), apresentam classificação toxicológica I, são extremamente tóxicos. Exibem valores de DL_{50} oral em ratos de 0,9 e 8,0 $mg\ kg^{-1}$, respectivamente, razão pela qual o envenenamento de trabalhadores rurais por exposição direta a esses agrotóxicos é muito comum (BOGIALLI et al., 2004; PROENÇA et al., 2004; NUNES et al., 2002; LACASSIE et al., 2001).

Aldicarbe apresenta elevada toxicidade aguda para mamíferos ($DL_{50} = 0,3-1,5\ mg\ kg^{-1}$) dependendo do veículo de administração usado. A toxicidade aguda de aldicarbe sulfóxido também é similar à do aldicarbe (BARON, 1994). O metabolismo do aldicarbe envolve hidrólise do éster carbâmico e oxidação do enxofre em derivados sulfóxido e sulfona. Os produtos de hidrólise são compostos sem atividade inseticida ou com pouca atividade inseticida e pouco tóxicos a outros organismos. Já os produtos da oxidação são inibidores colinesterásicos (RISHER et al., 1987).

Podem ser absorvidos por via oral, respiratória e dérmica (MORAES, 1999). Uma vez absorvido, os carbamatos são rapidamente distribuídos aos tecidos e órgãos. O metabolismo e a eliminação são relativamente rápidos, e não há evidências de haver bioacumulação de carbamatos (RISHER et al., 1987).

Os limites máximos de resíduo (LMR) permitido para aldicarbe e carbofurano em leite são respectivamente: 10 e 100 $\mu g\ L^{-1}$, segundo a União Européia e, 2 e 100 $\mu g\ L^{-1}$ segundo a Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos (Food and Drug Administration – FDA) (BOGIALLI et al., 2004). Os valores permitidos para aldicarbe e carbofurano em água para consumo são respectivamente: 10 e 7 $\mu g\ L^{-1}$ (WHO, 2004). Em grãos de café, o *Codex Alimentarius* (2009) estabelece o LMR para aldicarbe de 0,1 $mg\ kg^{-1}$, já a ANVISA (2010) estabelece que a quantidade máxima de aldicarbe e carbofurano em solos de cultura de café é de 0,1 $mg\ kg^{-1}$ e o intervalo de segurança (IS), estabelecido pelo primeiro, é de 90 dias.

O aldicarbe, depois de sua aplicação, é rapidamente transformado em aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona. Ele também pode ser degradado em oximas e nitrilas (NUNES et al., 2000). É muito persistente em águas subterrâneas, particularmente aquelas com caráter ácido, a meia-vida para degradação a produtos não tóxicos varia de poucas semanas a muitos anos. O modo primário de degradação é a hidrólise química, embora, também possa ser por decomposição microbiana (WHO, 2003).

O principal metabólito do carbofurano é o 3-hidroxicarbofurano, quimicamente conhecido por 2,3-dihidro-2,2-dimetil-3-hidroxi-7-benzofurano. Sua ocorrência se dá pelo processo de hidroxilação, o qual pode ser oxidado com a formação do 3-cetocarbofurano ou hidrolisado para formação do 3-hidroxi-7-fenol ou ainda a formação de conjugado (WHO, s.d.).

No solo, o carbofurano é degradado por hidrólise, ação microbiana e fotodecomposição. Sua persistência é dependente do valor do pH, do tipo de solo, temperatura, composição da mistura, e da população microbiana. Estudos no campo indicam que tem uma meia-vida de 26 a 110 dias em solos. Na água, pode ser degradado por hidrólise, decomposição microbiana e fotólise (WHO, s.d.).

A FMC Corporation (1997) concluiu que o carbofurano e seus metabólitos são estáveis após hidrólise ácida em uma grande variedade de commodities e podem ser armazenados refrigerados por 8 meses.

Em função da elevada toxicidade, possuem uso restrito aos estados de Minas Gerais, São Paulo e Bahia, apenas para agricultores cadastrados e certificados. Esses agricultores foram treinados por uma equipe de técnicos contratados com essa finalidade específica, e só recebem o certificado após se mostrarem aptos para aplicação do produto em suas lavouras, incluindo a conscientização dos problemas gerados pelo seu desvio aos centros urbanos. (ANVISA, 2009a).

A análise do risco ambiental decorrente do uso de um determinado agrotóxico deve conduzir a normas reguladoras, incluindo tanto a análise do grau de exposição quanto seus efeitos ambientais. A avaliação de risco dos agrotóxicos consta dos seguintes parâmetros: identificar o perigo, avaliação da dose resposta, estimativa da exposição, caracterização do risco e o gerenciamento. Para análise de exposição supõe conhecer as vias de dispersão do composto químico no meio ambiente e ser capaz de estimar e prever as concentrações que estes compostos podem alcançar nos distintos compartimentos do ecossistema (SILVA, 2004).

A contaminação de recursos hídricos com resíduos de aldicarbe e carbofurano pode colocar em risco não apenas os seres humanos, mas também a fauna aquática. Com relação à água potável, a legislação brasileira estabelece o limite máximo permitido de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, no caso de compostos

carbamatos. Em países da Europa, esse limite é bem menor, sendo inferior a $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (PATRÍCIO et al., 2002).

As análises de água potável da cidade de Pará de Minas na estação seca (julho/98), após as primeiras chuvas pós-seca (agosto/98) e na estação chuvosa (janeiro/99), não revelaram valores acima do LD (limite de detecção) para nenhum agrotóxico N-metilcarbamato ou metabólito. As concentrações dos agrotóxicos carbofurano e metomil quantificadas nas amostras ficaram abaixo dos limites estabelecidos pelas legislações brasileira e americana. Entretanto, os valores de agrotóxicos quantificados em alguns pontos mostraram-se acima dos limites estabelecidos na legislação européia (PARREIRA et al., 2001).

García de Llasera e Bernal-González (2001) avaliaram a presença de agrotóxicos carbamatos em áreas agrícola e industrial do México. A detecção foi por CLAE/fluorescência e foram encontrados resíduos de 3-hidroxi-carbofurano e metiocarbe.

A toxicidade aguda de alguns agroquímicos utilizados na cultura de arroz irrigado sobre juvenis de carpa (*Cyprinus carpio*) também foi avaliada. Os produtos Furadan, Ronstar, Goal, Facet e Gamit foram os que ofereceram maiores riscos ambientais exigindo cuidados após sua aplicação no sentido de evitar o deslocamento dos mesmos para fora das lavouras (RESGALLA JUNIOR et al., 2002). Patrício et al. (2002) constataram que o valor de CL_{50} (concentração letal) do aldicarbe para *Orthospinus franciscensis*, uma espécie nativa de piaba, comumente encontrada na Região Sudeste foi $1,12 \text{ mg.L}^{-1}$.

Pessoa et al. (2003) estudaram a tendência de movimento vertical de aldicarbe e tebuthiuron em solos do submédio São Francisco. Verificaram que o aldicarbe apresentou maior mobilidade inicial, intensificada a partir do segundo ano depois da aplicação, e menor tendência a risco a partir do segundo ano, onde as concentrações remanescentes são praticamente nulas. O deslocamento miscível do inseticida sulfona de aldicarbe nas principais regiões produtoras de batata de Minas Gerais: Conselheiro Lafaiete, Maria da Fé e Bueno Brandão foi estudado por Correa et al. (1999). O agrotóxico estudado, em condições de fluxo em solo saturado, apresentou pouca interação e alta mobilidade nos solos estudados.

Assim, estudos sobre a toxicidade do aldicarbe a outras espécies nativas de peixes e o contínuo monitoramento de seus resíduos em recursos hídricos,

em solos e em áreas onde o seu uso é intensivo são de suma importância para a avaliação do impacto ambiental do composto em ambientes aquáticos.

A presença desses resíduos de agrotóxicos tem sido verificada também em alimentos. Resíduos de aldicarbe foram detectados em amostras de tomate analisadas pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA). Tal princípio ativo não possui uso autorizado para a cultura, demonstrando que há necessidade de se combater a prática de utilização de agrotóxicos não autorizados para a cultura, pois das 1773 amostras de frutas e verduras analisadas pelo PARA em 2008, 271 encontravam-se em situação insatisfatória, sendo que dessas, 99,6% foram pelo uso não autorizado (ANVISA, 2009b).

Apesar das legislações vigentes, verifica-se que em muitas situações a falta de controle na comercialização e a falta de conhecimentos aos critérios que devem ser adotados durante o uso de agrotóxicos, possam estar comprometendo a saúde humana e o meio ambiente.

Resíduos de carbofurano foram encontrados em grãos de café verdes colhidos 30 dias após a última de duas aplicações de 1,5 g/cova/aplicação. O intervalo das aplicações foi próximo de 6 meses e a concentração de carbofurano nos grãos de café verdes variaram de 0,05 a 2,55 g kg⁻¹ (FMC CORPORATION, 1997). Os valores obtidos nesse estudo foram maiores que o LMR estabelecido pela ANVISA e pelo *Codex Alimentarius*.

A presença de resíduos de metabólitos do carbofurano em grãos de café torrado e em café instantâneo, ambos processados de grãos de café verde também foi avaliada pela FMC Corporation (1997). Concluíram que não é necessário estabelecer tolerâncias de resíduos de agrotóxicos para esses outros tipos de grãos, uma vez que o LMR estabelecido para o grão de café verde é adequado para cobrir os resíduos esperados nos cafés processados.

Os resíduos de clorpirifós, diclorvós e paration metílico adicionados ao pó de café e remanescentes na borra e na bebida de café, após a preparação por meio da extração aquosa a quente foram analisados por Oliveira et al. (2002). Constataram que a preparação da bebida de café provocou redução do diclorvós e clorpirifós adicionados ao pó de café, enquanto que o paration metílico manteve-se estável. A maior parte dos agrotóxicos manteve-se na borra. Já Reis (2007) apresentou resultados de alguns estudos realizados que visaram a determinação de resíduos de agrotóxicos em grãos de café. Nenhum

dos produtos estudados (BHC, endossulfam, eldrin e lindano) foi encontrado acima do limite de tolerância em grãos de café. Destacou também que, a torração dos grãos de café reduz os níveis de resíduos de endossulfam a valores abaixo ao LMR. A época de aplicação do produto, também é um fator importante na quantidade de resíduos nos grãos de café, pois quanto mais próximo da colheita o produto for aplicado, maior será a concentração de resíduo, mostrando então a necessidade de se obedecer ao período de carência.

3.3. INTOXICAÇÕES

Manufaturado na forma de pequenos grânulos, com 15% de princípio ativo (TEMIK 150), o aldicarbe é popularmente conhecido no Brasil como “chumbinho” (XAVIER, et al., 2007), não só pela cor cinza-chumbo, mas também pelo formato de pequenos grânulos arredondados que lembram a forma de chumbinho utilizado como munição nas armas de fogo (MELITO, 2004).

Tem-se verificado atualmente o uso irregular e indiscriminado desses compostos (principalmente aldicarbe) no país como raticida, bem como em tentativas de homicídio e de suicídio, acarretando em um grave problema de saúde pública, de amplitude nacional, dada a facilidade que se tem a seu acesso, particularmente nos centros urbanos e em feiras livres (PASSAGLI et al., 2009b; ANVISA, 2009a).

Além do aldicarbe, encontrado em 50% dos chumbinhos analisados, outros agrotóxicos também encontrados em amostras analisadas foram carbofurano, terbufós, forato, monocrotofós e metomil (ANVISA, 2009a)

MORAES (1999) demonstrou em seu trabalho, as intoxicações ocorridas no Rio de Janeiro, salientando principalmente a importância das intoxicações por chumbinho, um agrotóxico que por ser desviado do seu uso exclusivo como inseticida e usado no comércio informal como raticida e tem contribuído muito para o aumento do número de casos de envenenamento no estado, e também no país.

Depois de observarem dezoito pacientes com sintomas colinérgicos e outros dois com histórico de intoxicação por aldicarbe admitidos em uma

Unidade de Emergência da França, Ragoucy-Sengler et al. (2000) afirmaram que a intoxicação por aldicarbe é muito severa. Quatro desses pacientes tiveram sérias complicações, sendo que dois desses faleceram. Intoxicações por aldicarbe e carbofurano, entre outros, também foram relatadas por Lacassie et al. (2001). Um homem de 72 anos de idade após ingerir carbofurano foi a óbito e um homem de 57 anos após ingestão de aldicarbe intoxicou-se voluntariamente.

No ano de 2003, foram registrados 721 casos de intoxicações por raticidas nas 31 Diretorias Regionais de Saúde (DIRES) do Estado da Bahia, sendo que em 83% dos casos (598 registros), o chumbinho foi o principal agente tóxico, e a principal causa observada foi a tentativa de suicídio, correspondendo a 69,4 % dos casos (415 registros) (MARTINS, 2005).

Um homem de 24 anos de idade foi encontrado morto em sua cela, na Ilha de São Tomé e Príncipe (África). As análises toxicológicas revelaram concentrações tóxicas de aldicarbe em amostras *post-mortem*: sangue ($6,2 \mu\text{g mL}^{-1}$), estômago ($48,9 \mu\text{g g}^{-1}$), coração ($6,70 \mu\text{g g}^{-1}$) e urina ($17,50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Sendo assim, a morte foi devida a intoxicação aguda por aldicarbe, embora não puderam afirmar se foi suicídio ou homicídio (PROENÇA et al., 2004).

Intoxicação aguda moderada de onze reeducandos da Agência Prisional de Goiás, foi relatada por Azeredo et al. (2005). Os detentos ingeriram aldicarbe com refrigerante sabor cola para que pudessem apresentar sinais e sintomas de intoxicação e assim, serem transferidos para um hospital e serem resgatados da prisão. Como a intoxicação foi moderada, os cuidados foram prestados na própria Agência Prisional.

Como pode-se observar, o aldicarbe está entre os raticidas mais usados. Taga e Oliveira (2006) relataram um caso de envenenamento em virtude do uso ilegal desse agrotóxico no Brasil, em amostra de bebida de café. Em seu trabalho, foram analisadas amostras de café torrado e moído, e de bebida de café enviadas pela SSP-SP (Secretaria de Segurança Pública de São Paulo). Utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna de fase reversa, e detecção por espectrofotometria ultravioleta foi constatada em uma amostra de bebida de café a presença de aldicarbe, comprovando assim o envenenamento. A mistura do chumbinho em café (pó e bebida) é uma alternativa frequente de envenenamento em função do forte odor e cor do café que disfarçam a presença do chumbinho.

Junto ao IML-DF (Instituto Médico Legal), Oliveira Filho et al. (2008) quantificaram o número de óbitos após intoxicação por inseticidas carbamatos no Distrito Federal, entre os anos de 2000 a 2004. Nesse período foram notificados 72 casos de suspeita de intoxicação por carbamatos, sendo o mesmo confirmado em 13,9% dos casos. Desses, 90% foram ocasionadas por Aldicarbe e 10% por Carbofurano.

Ilustrando ainda mais a problemática do uso irregular e clandestino de Aldicarbe e Carbofurano, seguem alguns relatos tristes que cotidianamente são divulgados em noticiários nacionais:

Em julho de 2006, três alunas de uma escola pública municipal, tentaram envenenar a diretora, dissolvendo chumbinho no café servido na sala dos professores. Uma professora percebendo o odor forte e desagradável alertou a diretora e assim, o envenenamento não se consumou (ALUNAS tentam envenenar diretora, 2006).

Nesse mesmo mês, um pedreiro mineiro de Alto Paranaíba, colocou Temik 150 no pó de café para matar a família e ficar com o imóvel onde os mesmos residiam. Foram intoxicadas 4 pessoas e ninguém faleceu. O pedreiro foi preso em flagrante (TENTOU matar..., 2006).

Em agosto de 2006, uma mãe após discutir e brigar com o companheiro, colocou chumbinho no mingau da filha, levando a mesma à óbito (MÃE colocou..., 2006).

Em novembro de 2007, dez funcionários de um hospital em Salvador foram envenenados tomando café com chumbinho. A bebida estava em uma garrafa térmica na copa do hospital e havia sido preparada na cozinha do hospital. Nenhum funcionário faleceu (FUNCIONÁRIOS de hospital bebem..., 2007).

Em fevereiro de 2009, uma adolescente de 15 anos tentou envenenar os pais, a avó e tia colocando chumbinho no pó de café durante o preparo da bebida, em Peruibe, São Paulo. Nenhuma das 4 pessoas faleceu (ADOLESCENTE..., 2007).

Em novembro de 2009, uma aluna em Juiz de Fora (MG) colocou chumbinho em um galão de água na sala dos professores, como consequência, 30 pessoas foram intoxicadas (ALUNA é acusada..., 2009).

Em dezembro de 2009, a atriz Leila Lopes foi encontrada morta em seu apartamento no Rio de Janeiro. A suspeita é que tenha ingerido chumbinho com comida (LEILA Lopes..., 2009).

A problemática do uso irregular e clandestino de aldicarbe e carbofurano atinge vários países, e não somente o Brasil, com clara repercussão à Saúde Pública e à sociedade, devido ao grande número de pessoas intoxicadas por estes compostos em suicídios, assassinatos e acidentes com crianças. Quando empregados com esta finalidade, o chumbinho é misturado a alimentos, como bombons, marmitas, refrigerantes, achocolatados, café, pó de café, etc.

Tendo em vista tudo o que foi apresentado, pode-se perceber que vem aumentando cada vez mais os problemas de interesse forense, além dos já citados interesses agrícolas, em virtude das contaminações ambientais. E a mistura do chumbinho em café (pó e bebida) é uma alternativa frequente de envenenamento em função do forte odor e cor do café que disfarçam a presença do mesmo.

3.4. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE

O uso de agrotóxicos em lavouras cujos produtos são destinados ao consumo humano ou animal pode conduzir a resíduos após sua colheita. Os alimentos ainda podem conter resíduos remanescentes de utilização durante o armazenamento e transporte. Por outro lado, os agrotóxicos podem se mover do local de aplicação e se transportar para outro lugar no meio ambiente e podem ser transferidos para a cadeia alimentar. A capacidade de um agrotóxico persistir por certo período de tempo pode ser desejável e tem sido considerado como importante em algumas situações para o controle bem sucedido de pragas e doenças. Todavia, a presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos e no meio ambiente preocupa o consumidor e as autoridades competentes, já que pode oferecer riscos para a saúde humana e ambiental.

As técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem que as análises dos componentes de interesse se tornem possíveis. A meta final é a obtenção de uma subfração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico, de forma que se obtenha uma separação

cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise. E visando alcançar os limites de quantificação cada vez mais baixos, conduziu ao desenvolvimento de técnicas de extração e pré-concentração de agrotóxicos cada vez mais eficientes. Os métodos mais frequentemente empregados são: extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (EFS) (QUEIROZ et al., 2001).

A ELL é uma técnica muito usada em métodos padrões, sendo recomendada pela EPA (PICÓ et al., 2007), baseia-se na partição da amostra entre duas fases imiscíveis (aquosa e orgânica). As principais vantagens são: simplicidade, variedade de solventes, puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade (QUEIROZ et al., 2001). Entretanto, tem inúmeras desvantagens como o fato de poder formar emulsão, requerer grandes volumes de solventes, muitas vezes tóxicos e inflamáveis, demandar longo tempo de extração, além de ser trabalhosa e de difícil automação (TOTTI et al., 2006; LAMBROPOULOU e ALBANIS, 2005; BIZIUK et al., 1996).

Segundo Valenzuela et al. (1999), a ELL tem sido usada na extração de carbamatos e outros agrotóxicos em diversas matrizes ambientais. E os solventes mais frequentemente empregados tem sido: diclorometano e diferentes misturas como diclorometano:cicloexano e diclorometano:acetona. Porém, como os solventes utilizados não são seletivos, eles extraem muitos co-extrativos da matriz, necessitando então de uma etapa posterior de *clean-up* (VALENZUELA et al., 1999; BIZIUK et al., 1996).

A EFS, apesar de ser mais recente que a ELL, apresenta maior aceitação como uma ferramenta eficiente na extração e enriquecimento de frações de agrotóxicos em soluções onde se encontram muito diluídos como a água, gerando concentrações suficientes do analito para detecção (PICÓ et al., 2007). Além disso, a fase sólida retém com eficiência analitos presentes em líquidos, gases ou fluidos supercríticos, associando enorme versatilidade à técnica (ALQUINO NETO e NUNES, 2003). É uma das ferramentas mais poderosas e mais empregadas para extração e/ou concentração de analitos presentes em matrizes complexas (QUEIROZ et al., 2001).

As principais vantagens da EFS são: menor tempo de análise, consumo reduzido de solvente orgânico, ser menos trabalhosa, promover o enriquecimento de traços e apresenta alto potencial para automatização

(ALQUINO NETO e NUNES, 2003). Logo, pelas inúmeras vantagens apresentadas, a EFS tem se tornado uma das técnicas mais utilizadas para extração de N-metilcarbamatos (NUNES et al., 1998; GARCÍA de LLASERA e BENAL-GONZÁLEZ, 2001). É tradicionalmente usada na forma de cartuchos, sendo a fase estacionária um sorvente, porém, Silva et al. (1999) relataram como desvantagens entupimento, falta de reprodutibilidade e a não reutilização dos cartuchos.

A FMC Corporation (1997) realizou a determinação de resíduos de carbofurano e seus metabólitos em amostras de grãos de café usando a EFS com uma coluna de C_{18} acoplada a cartucho de amino-propil. Os resíduos foram eluídos com 1% de metanol em diclorometano, evaporados e redissolvidos em acetonitrila para análise por CLAE/fluorescência, utilizando uma coluna de fase reversa (C_{18}) e eluição gradiente da fase móvel acetonitrila:água. Os limites de quantificação e detecção obtidos para os carbamatos foram respectivamente: 0,05 e 0,01 mg L⁻¹.

A miniaturização de processos traz inúmeras vantagens, em especial, menor consumo de amostra e solvente, menor tempo, redução de efluente e rejeito e maior facilidade de automação. Dessa forma as vantagens da EFS podem ser ainda maiores com o uso da microextração por fase sólida (MEFS), em que uma fibra de fase estacionária é operada com extensão de um êmbolo de uma seringa de cromatografia (ALQUINO NETO e NUNES, 2003).

Baseada no equilíbrio entre fases e aplicada na extração de diversos grupos de analitos voláteis e semi-voláteis em matrizes tais como água, ar e solo. Entre as vantagens estão: simplicidade de amostragem, baixo custo, a não utilização de solventes, maior precisão, menor limite de detecção, reutilização da fibra e fácil automação. A fibra (sílica fundida coberta por uma fase estacionária) adaptada em uma seringa, para efetuar a extração dos analitos, pode ser colocada diretamente na amostra ou em "Headspace" (SILVA et al, 1999), na qual a amostra é freqüentemente aquecida e os componentes voláteis são adsorvidos na fibra (QUEIROZ et al., 2001). A única condição que se faz é que o analito necessita ser volátil e termicamente estável para ser desorvido e determinado por CG. Segundo Basheer e Lee (2004) essa técnica combina simultaneamente extração e pré-concentração dos analitos em várias matrizes. Entretanto, Basheer et al. (2009) ressaltam que as fibras utilizadas são frágeis e de custo mais elevado.

A microextração em fase líquida (MEFL) é a miniaturização da ELL convencional, o qual apenas microlitros de solventes são usados em vez de centenas de mililitros em ELL. É rápida, barata e pode ser facilmente automatizada. Nessa técnica, uma pequena quantidade de solvente é impregnado na membrana da fibra oca (HOU e LEE, 2004). Há liberdade de selecionar solventes apropriados para extração de diferentes analitos, os quais podem ser injetados no CG e essa técnica combina extração, concentração e introdução de amostra em uma única etapa (LAMBROPOULOU e ALBANIS, 2005).

Lambropoulou e Albanis (2005) utilizaram a MEFL para extrair 7 organofosforados e um carbamato (carbofurano) de amostras de águas superficial e de consumo. A análise foi realizada por cromatografia gasosa e detector termiônico de chama. Os limites de detecção ficaram abaixo de 72 ng L⁻¹. As porcentagens de recuperação ficaram entre 80 e 104 % com desvios-padrão abaixo de 12%.

Uma das técnicas também promissoras a reduzir a extração de interferentes da matriz é a dispersão de matriz em fase sólida (DMFS). Esta envolve a dispersão da amostra sólida ou semi-sólida em um adsorvente sólido e eluição dos analitos com ligeiro volume de solvente. Além disso, as etapas de extração e *clean-up* ocorrem em uma mesma etapa, diminuindo o tempo de análise e consumo de solventes orgânicos (PINHO et al., 2009a; PICÓ et al., 2007; TOTTI et al., 2006; VALENZUELA et al., 1999).

A DMFS tem sido citada por Fernández et al. (2000) como uma boa alternativa para extração de carbamatos e outros agrotóxicos por causa de sua simplicidade e robustez. Consome muito pouco solvente e evita a formação de emulsão.

A dispersão de matriz em fase sólida foi utilizada por Totti et al. (2006) (DMFS), tendo C₁₈ como dispersante e diclorometano-metanol como eluente. A cromatografia líquida de ionização química a pressão atmosférica e espectrometria de massas (CLAE-IQPA/EM) foi usada para a determinação simultânea de imidacloprido, ácido 6-cloronicotínico, carbaril, aldicarbe, aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona em abelhas.

Benfuracarbe (carbamato) e quatro inseticidas foram extraídos de laranjas e determinados por CLAE-UV utilizando a DMFS para microextração (VALENZUELA et al., 1999).

O carbofurano e outros 12 carbamatos foram analisados em frutas e vegetais por DMFS seguida de CL/EM. Diferentes fases sólidas (C₈, C₁₈, ciano, amino e fenil) foram testadas, sendo obtidas melhores porcentagens de recuperação com C₈, às quais variaram de 64 a 106%, com desvios-padrão relativo abaixo de 15% e limites de detecção entre 0,001 e 0,01mg kg⁻¹ (FERNÁNDEZ et al., 2000).

Bogialli et al. (2004) utilizaram a DMFS para determinação de seis carbamatos, entre eles aldicarbe e carbofurano, em amostras de leite bovino. O solvente extrator utilizado foi água aquecida, a qual mostrou ser uma proposta ambientalmente segura, para extração de contaminantes polares e medianamente polares. A análise foi realizada por CL/EM e as porcentagens de recuperação obtida foram acima de 76% com desvios-padrão abaixo de 8%. Os limites de detecção para aldicarbe e carbofurano foram 3 e 4 µg L⁻¹.

Em matrizes complexas, a recuperação dos agrotóxicos normalmente ocorre por extração exaustiva com uma variedade de solventes orgânicos: hexano, éter de petróleo, acetona, acetonitrila, metanol e suas combinações. Os métodos variam desde simples agitação e outros mais exaustivos como a extração por Soxhlet até métodos mais modernos como Extração por Fluido Supercrítico ou Extração Assistida por Microondas (TAYLOR et al., 2002).

A análise de substâncias presentes em matrizes complexas como soro, plasma, urina e amostras ambientais, em geral, requer um pré-tratamento da amostra. As razões para isso são inúmeras, destacando a complexidade das matrizes biológicas e ambientais, das quais os compostos são obtidos, a existência de proteínas que são incompatíveis com as colunas cromatográficas e a concentração das substâncias a serem analisadas, a nível traço (QUEIROZ et al., 2001). A extração de resíduos de pesticidas de vegetais e frutas produz misturas complexas que frequentemente requerem purificação de amostras e procedimentos de preparo para isolar os analitos para análise (TAYLOR et al., 2002).

Um *clean up* simples e barato, que evita o uso de solventes tóxicos e evita perdas do analito vem sendo utilizado em extratos lipídicos de vegetais e animais para análise de resíduos de agrotóxicos organoclorados e organofosforados é a precipitação por abaixamento da temperatura (JUHLER, 1997; LENTZA-RIZOS et al., 2001). Partição líquido-líquido combinada com precipitação a baixa temperatura é uma combinação simples que vem sendo

utilizada para análise de agrotóxicos em matrizes gordurosas (GILBERT-LÓPEZ et al, 2009).

Juhler (1997) desenvolveu e otimizou a determinação de resíduos de organofosforados em carnes e matrizes gordurosas por cromatografia gasosa com detector nitrogênio e fósforo. A extração foi realizada com acetato de etila e água e o clean-up foi feito pelo congelamento dos extratos que favoreceu a precipitação das gorduras combinado à extração em fase sólida com colunas C₁₈. Tais procedimentos resultaram em um *clean up* suficiente para a determinação de sete agrotóxicos organofosforados, com limite de detecção de 1 a 20 µg kg⁻¹.

A partir daí, outros trabalhos começaram a ser desenvolvidos utilizando o abaixamento de temperatura como *clean-up* para extração de agrotóxicos. Lentza-Rizos et al. (2001) desenvolveram um simples, rápido e eficiente método de *clean-up* por precipitação a baixa temperatura para análise de resíduos de agrotóxicos em óleo de oliva.

Goulart et al. (2008) desenvolveram uma metodologia simples e de baixo custo para análise de deltametrina e cipermetrina em amostras de leite por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons. Utilizaram a extração líquido-líquido e purificação por precipitação a baixa temperatura e, obtiveram as seguintes porcentagens de recuperação: 93% para cipermetrina e 84 % para deltametrina.

O princípio da extração líquido-líquido e purificação a baixa temperatura consistiu em colocar a amostra líquida (ou sólida) em contato com um solvente miscível em água e menos denso que esta, e que tenha ponto de fusão abaixo de -20 °C. Em seguida a mistura foi agitada e levada ao freezer por um tempo suficiente que permitiu o congelamento da fase aquosa. Após o congelamento da fase aquosa, a fase orgânica contendo os analitos (parte superior) foi extraída, e filtrada com sulfato de sódio anidro para eliminar a possível presença de água. Finalmente, o extrato foi analisado por cromatografia, fornecendo boas porcentagens de recuperação e limites de detecção de 0,25 µg L⁻¹ (GOULART et al., 2008; GOULART, 2004).

O método foi aperfeiçoado por Vieira et al. (2007) para extração simultânea de cipermetrina, deltametrina, λ-cialotrina e permetrina em amostras de água e solo. A técnica passou a ser denominada extração líquido-

líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) e extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) e apresentou limites de detecção que variaram de 1,1 a 3,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (VIEIRA et al., 2007; VIEIRA, 2005b).

E posteriormente, em virtude dos bons resultados obtidos com essa nova técnica, a mesma foi aplicada a amostras de alimentos como análise de clorpirifós, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em batata (DARDENGO, 2007), em tomate (PINHO, 2007), e em mel (PINHO, 2009), clorpirifós e thiametoxam em batata (BITTENCOURT, 2008), clorpirifós, thiametoxam e deltametrina em maçã (PUSSENTE, 2008) e clorpirifós, endossulfam, cipermetrina e deltametrina em carne bovina (SILVA, 2008).

A aplicabilidade dessa técnica está nos bons resultados obtidos com extração de princípios ativos em matrizes sólidas e líquidas, e na possibilidade de se realizar em um único passo a extração de agrotóxicos e o *clean-up* dos extratos, além de redução do uso de solventes orgânicos e quantificação em nível de ppb por CG.

As técnicas analíticas instrumentais mais empregadas na análise de resíduos de agrotóxicos são: a cromatografia gasosa (CG) com detecções por: captura de elétrons (ECD), nitrogênio e fósforo (NPD), fotométrico de chama (FPD), espectrometria de massas (EM) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detectores: ultravioleta/visível (UV/vis), fluorescência (FI), espectrometria de massas (EM) e espectrometria de massas em série (EM / EM). A combinação destas etapas possibilita o desenvolvimento de métodos analíticos multirresíduos mais sensíveis e seletivos para amostras ambientais e de alimentos (GALLI et al.; 2006; BARRIONUEVO e LANÇAS, 2001; BARCELÓ, 1993). Essas técnicas são muito importantes na análise química, pois permitem efetuar as separações, identificar e quantificar as espécies presentes na amostra por meio da utilização de detectores específicos (GALLI et al., 2006).

Os sistemas cromatográficos modernos têm ampla aplicabilidade na maioria das indústrias, no desenvolvimento de novos produtos e no controle de qualidade de produção, e são indispensáveis nas análises do meio ambiente, no controle *antidoping*, nas investigações forenses, entre outros (PASSAGLI et al., 2009a).

Compostos orgânicos contendo nitrogênio (N) e fósforo (P) são frequentemente analisados por cromatografia gasosa acoplada ao detector seletivo nitrogênio e fósforo (CG/DNP). Já os halogenados são determinados utilizando cromatografia gasosa acoplada ao detector por captura de elétrons (CG/DCE). A cromatografia gasosa com espectrômetro de massas tem sido extensivamente usada para identificação e determinação de analitos e a cromatografia líquida com detecção ultravioleta (UV), arranjo de diodos (DAD) espectrômetro de massas (EM) e fluorescência (FI) têm sido aplicada na determinação de compostos de largo espectro (BIZIUK et al., 1996).

Nas análises de rotina, são utilizadas a cromatografia em camada delgada (CCD), a cromatografia gasosa com detector de massas (CG-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para identificação dos carbamatos. Os solventes orgânicos recomendados em cada uma dessas técnicas para análise dos carbamatos são, respectivamente, acetona, clorofórmio ou diclorometano e acetonitrila ou metanol (PASSAGLI et al., 2009b).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de absorção que utiliza da separação líquido-sólido. Essa separação dá-se pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. Por ser um método de simples aplicação, visual, e de baixo custo, tem uma enorme aplicação na separação de misturas (PASSAGLI et al., 2009a).

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica sofisticada, sendo considerada uma das mais importantes disponíveis atualmente, pois apresenta excelente poder de resolução, precisão e sensibilidade, permitindo a determinação qualitativa e quantitativa simultânea de vários compostos em matrizes complexas. É adequada a separação e análise de misturas de substâncias voláteis ou que possam ser volatilizadas, aplicando-se a amostras gasosas, líquidas ou sólidas desde que os analitos não sofram decomposição térmica. Pode ser aplicada à análise de misturas cujos constituintes apresentem pontos de ebulição de até 300 °C e que sejam termicamente estáveis (PASSAGLI et al., 2009a; BONATO, 2006).

A cromatografia gasosa tem sido a técnica selecionada para a análise de muitos agrotóxicos em frutas e verduras. Entretanto, nos últimos anos, pode-se observar uma tendência para o uso de agrotóxicos mais polares, os quais apresentam menor persistência e toxicidade que os apolares. Os compostos

polares iônicos são menos adequados para análise usando CG, e isto implica no uso de técnicas alternativas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (JARDIM et al., 2009).

A CLAE tem sido a técnica analítica mais desenvolvida, difundida e empregada em laboratórios de análise de indústria químicas e farmacêuticas, em áreas médicas e em muitos outros campos da ciência e até em órgãos governamentais (MALDANER e JARDIM, 2009). Utiliza instrumentos que podem ser totalmente automatizados. Tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (JARDIM et al., 2006).

As separações analíticas em análises forenses são preferencialmente realizadas com cromatografia líquida em fase reversa (fase móvel tem caráter polar, enquanto que a fase estacionária tem caráter mais apolar). A fase estacionária mais usada é C₁₈ e a grande versatilidade desta técnica reside na possibilidade de utilizar água, acetonitrila ou metanol como únicos eluentes e ácido fórmico e trietilamina como aditivos e mesmo assim gerar um grande número de fases móveis, com as quais temos a possibilidade de separar uma ampla quantidade de misturas complexas com alta eficiência (PASSAGLI et al., 2009a).

A maioria dos métodos desenvolvidos para determinação N-metilcarbamatos é baseado na separação por cromatografia gasosa e líquida (BASHEER et al., 2009; NUNES et al., 2000; NUNES et al., 1998; WHO, 1991). Embora, a determinação desses resíduos de carbamatos frequentemente seja considerada um problema.

A sensibilidade e precisão na determinação dos N-metilcarbamatos pode ser comprometida pelo tradicional método da cromatografia gasosa, uma vez que esses compostos são termicamente instáveis (BASHEER et al., 2009; LACASSIE et al., 2001; GARCÍA de LLASERA e BENAL-GONZÁLEZ, 2001; ABAD et al., 1999; PLEASANCE et al., 1992) e de natureza relativamente polar (TOTTI et al., 2006; NUNES et al., 2000). Assim, por causa da instabilidade térmica, aldicarbe e carbofurano podem degradar no injetor ou na coluna, durante análises por cromatografia gasosa (WHO, 1991). Em virtude disso, alguns autores acham que o mais conveniente é a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência com derivatização pós-coluna e detecção por

fluorescência, sendo este o método recomendado pela Environmental Protection Agency, EPA (DAMASCENO et al., 2008; BORKOVCOVÁ et al., 2004; GARCÍA de LLASERA e BENAL-GONZÁLEZ, 2001; PARREIRA et al., 2001; ABAD et al., 1999). Esses mesmos autores ressaltam que embora sensível e bem estabelecida, a técnica requer instrumentação complexa e cara, exigindo pessoal altamente qualificado. É também laboriosa e pode reduzir as porcentagens de recuperação de alguns compostos (NUNES et al., 1998). Esses últimos destacaram, porém, que técnicas de detecção seletiva como fluorescência e espectrometria de massas podem minimizar a etapa de *clean-up*, uma vez que excluem os co-extrativos co-eluídos junto com os NMC.

A determinação de traços de carbamatos em amostras de águas pode ser realizada por injeção direta usando sistema CLAE/fluorescência com derivatização pós-coluna (GARCÍA de LLASSERA e BERNAL-GONZÁLEZ, 2001).

Aldicarbe e seus produtos de oxidação poderiam ser determinados por cromatografia gasosa acoplada ao detector nitrogênio e fósforo após derivatização destes aos derivados nitrogenados. Porém, alguns procedimentos seriam difíceis e laboriosos de executar devido à instabilidade térmica, necessidade de preparo de amostras e etapa de *clean-up* para amostras complexas (Damasceno et al., 2008).

Assim, um método alternativo para análise de N-metilcarbamatos é a cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV). Este tipo de detector tem sido empregado na análise de aldicarbe (DAMASCENO et al., 2008; MARQUES et al., 2007; RAGOUC-SEGLER et al., 2000; NUNES et al., 1998), carbofurano (NUNES et al., 2006; NUNES et al., 1998), entre outros.

Independentemente da limitação da volatilidade ou estabilidade térmica, a CLAE requer somente que a amostra seja solúvel na fase móvel. Essa é muito importante, pois ela arrasta os componentes da amostra através do sistema cromatográfico e participa do processo de separação (JARDIM et al., 2006). Já o funcionamento dos detectores espectrofotométricos baseia-se na absorvância da luz por parte da amostra, ao passar através dela qualquer radiação eletromagnética. A resposta desse detector será seletiva, porque só detectará os compostos que absorvem no comprimento de onda em que opera o detector. Os compostos que absorvem radiação UV possuem elétrons π ,

elétrons desemparelhados, além de conter bromo, iodo, enxofre, carbonila (-C=O), grupo nitro (-NO₂), íons inorgânicos (Br⁻, I⁻, NO₃⁻, NO₂⁻) e duas duplas conjugadas (-C=C-C=C-) (JARDIM et al., 2006).

A determinação de aldicarbe, carbofurano e carbaril, além de três herbicidas em amostras de águas pertencentes à bacia hidrográfica do Vale do Ribeira de Iguapé, São Paulo foi otimizada por Marques et al. (2007). Utilizaram a EFS (colunas preenchidas com C₁₈) e CLAE-UV/Visível, um sistema “off-line”, onde a amostra foi extraída separadamente e posteriormente uma alíquota do extrato foi injetada no cromatógrafo. O aldicarbe não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. Já o carbofurano, foi encontrado em 14% das amostras (água superficial e tratada), fato coerente por ele estar entre os princípios ativos mais vendidos e aplicados na área de estudo. As concentrações encontradas foram extremamente baixas, mas apresentou indícios de contaminação pelo uso de agrotóxicos na região.

Um método multirresíduo empregando CLAE/DAD para a determinação de doze agrotóxicos em águas subterrâneas em lavouras de algodão foi desenvolvido por Carbo et al. (2008). Utilizaram a extração em fase sólida, usando um copolímero estireno divinilbenzeno (SDVB). As porcentagens de recuperação foram acima de 73%, o desvio padrão relativo foi inferior a 16% e limites de detecção variando de 0,06 a 0,57 µg L⁻¹. O método foi aplicado em 110 amostras de águas subterrâneas de lavouras de algodão localizadas em Primavera do Leste, Mato Grosso, Brasil. Dos agrotóxicos analisados, oito foram detectados nas amostras de água, incluindo aldicarbe e carbofurano, sendo que 18% continham pelo menos um dos agrotóxicos, com concentrações variando de 0,78 a 68,79 µg L⁻¹, excedendo em alguns casos, os níveis estabelecidos pela União Européia. Esses resultados confirmaram a vulnerabilidade do lençol freático no que diz respeito à contaminação por agrotóxicos.

Um método de determinação de arprocarbe, carbofurano, isoprocarbe e fenobucarbe foi proposto baseado em reações de derivatização. Os quatro carbamatos foram hidrolizados e submetidos a reação com 4-aminoantipireno para formar compostos coloridos, de maneira que puderam ser analisados por CLAE-UV/VIS na região do visível (ZHOU et al., 2009).

A cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas com interface ionização química à pressão atmosférica (CLAE-IQPA/EM) e para

determinar aldicarbe e seus dois maiores metabólitos (sulfóxido e sulfona) em frutas e vegetais também foi utilizada. O método foi seletivo e apresentou porcentagens de recuperação acima de 68% (NUNES et al., 2000).

A eficiência da extração em fluido supercrítico para análise de inseticidas carbamatos em amostras de batata foi avaliada por Nunes et al. (2002). Para as determinações cromatográficas, duas técnicas foram utilizadas: CLAE/fluorescência para quantificação e CLAE-IQPA/EM para quantificação e também confirmação de produtos de degradação. A técnica de extração em fluido supercrítico mostrou-se eficiente, na maioria dos casos, exceto para o agrotóxico carbaril, que não pôde ser extraído das amostras, devido provavelmente a algum efeito de matriz. A técnica mostrou-se rápida, barata e ambientalmente mais limpa. Entretanto, para alguns compostos, a reprodutibilidade foi insatisfatória, evidenciando a necessidade de estudos mais aprofundados. Comprovaram também que, a especificidade e a seletividade que foram alcançadas em análises diretas de carbamatos em matrizes complexas, por CLAE/fluorescência, por si só já justificariam o seu uso para quantificação dos compostos. A confirmação por CLAE/EM utilizando a interface IQPA foi necessária, uma vez que a metodologia de extração por fluido supercrítico estava sendo avaliada.

A adequação da CLAE/EM para análise de N-metilcarbamatos e seus metabólitos em vegetais e frutas também foi verificada por Taylor et al. (2002).

Lacassie et al. (2001) utilizaram a EFS para detecção de 61 agrotóxicos de interesse toxicológico em matrizes biológicas humanas. A quantificação e identificação dos compostos voláteis foi por CG/EM, enquanto que os compostos termicamente instáveis e polares foram determinados por CLAE/EM.

Barr et al. (2002) desenvolveram um método preciso para quantificar 29 agrotóxicos (organofosforados, carbamatos, piretroides, etc) em plasma humano, sendo esse método aplicado para análise de amostras de plasma em mulheres da cidade de Nova Iorque. O método empregou a extração em fase sólida seguido por cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução. Obtiveram limites de detecção abaixo de pg g^{-1} e detectaram concentrações de carbaryl/naftaleno, propoxur, bendiocarbe, clorpirofós, diazinon, captan, folpete e seus metabólitos em mais de 20% das amostras de plasma analisadas.

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL/EM) é uma das técnicas mais poderosas para a análise de resíduos de agrotóxicos polares iônicos, de baixa volatilidade ou instabilidade térmica. Instrumentos modernos de CL/EM empregando ionização à pressão atmosférica provêm excelentes seletividade e detectabilidade, que habilitam análises dos compostos-alvos em níveis de traços (JARDIM et al., 2009).

No entanto, é conveniente mencionar que a técnica por CLAE/EM é extremamente cara, não só pelo fato de que a própria análise requer grandes volumes de solventes, mas também devido à manutenção necessária do equipamento. A vantagem adicional, que se constitui no grande trunfo da técnica analítica CLAE-IQPA/EM, é que se pode, a um só tempo, determinar os resíduos dos agrotóxicos e confirmar a presença desses resíduos e de outros que porventura apareçam no cromatograma (NUNES et al., 2002).

Galli et al. (2006) citam que embora as técnicas cromatográficas apresentem bons limites de detecção, elas possuem como desvantagem a necessidade de um longo tempo para o preparo de amostras, uso de instrumentação cara, o que eleva o custo final das análises, propondo para isso, o uso de técnicas eletroanalíticas. Essas podem ser aplicadas para análise de amostras complexas, sejam estas biológicas ou ambientais. Entretanto, a análise de agrotóxicos carbaril e carbofurano, a detecção eletroanalítica só é possível pela determinação dos produtos de hidrólise em meio alcalino.

3.5. VALIDAÇÃO

Atualmente, há vários conceitos e definições, provenientes tanto de pesquisadores como de agências e normas reguladoras nacionais e internacionais, que objetivam responder questões como: qual a função da validação de métodos e de que maneira deve ser realizada (ARAGÃO et al., 2009; PASSAGLI et al., 2009c; PASCHOAL et al., 2008; BOTTOLI *et al.*, 2004; RIBANI et al., 2004; ANVISA, 2003; INMETRO, 2003; ICH, 2005).

Ribani *et al.*(2002) apresentaram, de maneira clara e objetiva, a validação de métodos como sendo um processo contínuo de avaliação dos métodos, desde a etapa de planejamento, passando pelo desenvolvimento e

coleta de dados, até o monitoramento constante da aplicação e transferência deste.

O objetivo desse cuidado nada mais é que garantir que os dados gerados possuam a qualidade necessária, em termos de confiabilidade e rastreabilidade, entre outros, para o fim que se propõe. Assim, deve-se selecionar, estudar e monitorar constantemente os parâmetros mínimos necessários para garantir a interpretação inequívoca dos resultados. As principais figuras de mérito envolvidas no processo de validação de métodos analíticos são: curva analítica, linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e de quantificação e seletividade.

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas. A primeira forma de avaliar a seletividade é comparar o cromatograma da matriz isenta da substância de interesse com o da matriz adicionada com esta substância. O método de adição de padrão também pode ser aplicado, porém é utilizado quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse. Neste caso é feita uma curva analítica com adição da substância de interesse na amostra e comparada com a curva analítica sem a presença da matriz. Outro procedimento para avaliar a seletividade é através da análise pela técnica cromatográfica, acoplada à espectrometria de massa (BOTTOLI *et al.*, 2004).

A linearidade de um método analítico pode ser definida como sendo a habilidade deste método em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma determinada faixa de concentração (PASSAGLI *et al.*, 2009c; RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2003).

Na prática, a linearidade é determinada através das chamadas curvas analíticas, que são gráficos de calibração que relacionam a resposta do equipamento em função das diferentes concentrações do analito. Para a maioria das técnicas cromatográficas, observa-se uma relação linear de primeira ordem entre a resposta instrumental medida (eixo y) (variável dependente) e a concentração do analito (eixo x) (variável independente). Essa

relação produz uma equação de regressão linear, Equação 1, que relaciona as duas variáveis x e y e gera os coeficientes de regressão 'a' (inclinação da curva) e 'b' (interseção da curva analítica com o eixo y , quando $x = 0$).

$$y = ax + b \quad (\text{Equação 1})$$

Essa equação é válida para um intervalo determinado de concentração do analito, independente da técnica instrumental utilizada. Também é possível calcular o coeficiente de correlação (r), que pode ser utilizado para estimar a qualidade da curva analítica uma vez que demonstra uma menor variação dos dados obtidos quanto mais próximo de 1 for o valor de r (RIBANI et al., 2004). Valores de r iguais ou superiores a 0,99 e 0,90, são recomendados, respectivamente, pela ANVISA (2003) e pelo INMETRO (2003).

A faixa linear de trabalho de um método é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração dos analitos no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e a linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio (INMETRO, 2003).

A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de concentração dos agrotóxicos para o qual o ensaio será aplicado, em que a concentração central deve ser, sempre que possível, a concentração previsível nos ensaios. Os valores inferiores dos limites de detecção e quantificação são considerados muitas vezes como a sensibilidade do método e devem ser distinguidos do branco do método. O limite superior da faixa de trabalho depende da limitação do sistema de resposta do equipamento, sendo que a linearidade do método deverá ser constante em toda a extensão da faixa de trabalho.

A quantificação do composto de interesse em validação pode ser obtida através dos seguintes métodos: padronização externa, padronização interna, superposição da matriz e adição de padrão. Os métodos mais comumente encontrados em métodos cromatográficos são padronização externa e padronização interna (BOTTOLI *et al.*, 2004; RIBANI et al., 2004).

O Limite de Detecção (LD) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O Limite de Quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida com precisão e exatidão, utilizando determinado procedimento experimental.

Existem diferentes procedimentos para estimar o LD, entre esses o método visual, razão sinal-ruído e a partir da curva analítica (ARAGÃO et al., 2009); a ANVISA (2003) sugere apenas que o LD deve ser estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável, recomendando que o LD seja 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base, no entanto, não fazendo referência se o estudo deve ser realizado com a matriz e o número de replicatas que devem ser realizadas. Segundo o INMETRO (2003), o LQ pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios padrão.

O LQ pode ser obtido por meio da análise da amostra branco adicionada de concentrações decrescentes do analito até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. O LQ deve corresponder ao primeiro nível de concentração da curva analítica. Determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1 (ANVISA, 2003). É importante ressaltar que o LQ deve ser menor que o LMR estabelecido para o analito (contaminante) em questão para que o método seja aceitável para a determinação de resíduo de agrotóxicos em alimentos.

A exatidão é uma medida da concordância existente entre os dados obtidos em uma determinada medida e um valor de referência assumido como sendo o verdadeiro (RIBANI et al., 2004). Na indisponibilidade de material de referência certificado, a exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de fortificação e recuperação (geralmente expressa em percentual), podendo esta ser calculada através da Equação 2.

$$R (\%) = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: C1 = Concentração determinada na amostra fortificada; C2 = Concentração determinada na amostra não fortificada; e, C3 = Concentração usada para fortificação.

Em geral, são aceitos intervalos de recuperação entre 70 e 120%, com precisão de até 20% para a maioria dos métodos analíticos, inclusive para análise de resíduos de agrotóxicos. Além disso, segundo Passagli et al.

(2009c) e ANVISA (2003) deve-se preparar em triplicata no mínimo três níveis de concentração que cubra toda a faixa linear da curva analítica. Para Bottoli et al. (2004) deve ter três concentrações, por exemplo, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permitida pelo método e uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. Na maioria dos casos a dispersão dos resultados, segundo esses autores, aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por este motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse.

A International Conference on Harmonisation (ICH, 2005) estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser obedecido.

Precisão é o termo geral utilizado para avaliar a dispersão dos resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou soluções analíticas de referência, analisadas em condições definidas (PASSAGLI et al., 2009c; INMETRO, 2003). Pode ser numericamente expressa em termos do desvio padrão relativo (DPR), também denominado coeficiente de variação (CV), o qual pode ser calculado pela Equação 3.

$$CV (\%) = \frac{\text{Desvio padrão das replicatas da amostra}}{\text{Média das replicatas da amostra}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos CV de até 20%, dependendo da complexidade da amostra. Uma maneira simples de melhorar a precisão é aumentar o número de replicatas. A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade; precisão intermediária; reprodutibilidade.

De acordo com o INMETRO (2003), a robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta em relação a pequenas variações dos seus valores otimizados. Considera-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. Em CLAE, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando-se o conteúdo de um dos constituintes da fase móvel em $\pm 2\%$, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em $\pm 5^\circ\text{C}$ (ARAGÃO et al., 2009).

Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (RIBANI et al., 2004).

Do ponto de vista da validação de métodos cromatográficos, os requerimentos necessários para a validação estabelecidos pelas agências reguladoras são basicamente os mesmos, independentemente do sistema de detecção utilizado. No entanto, quando a espectrometria de massas for empregada como sistema de detecção em associação com a cromatografia líquida, algumas considerações devem ser feitas em relação ao efeito matriz, uma vez que a matriz pode causar uma supressão da eficiência de ionização e, conseqüentemente, pode ocorrer uma redução na sensibilidade do método. Assim, esse parâmetro deve ser avaliado para validação de métodos empregando a LC-EM ou LC-EM-EM para garantir que a precisão, seletividade e sensibilidade não sejam afetadas (PASCHOAL et al., 2008).

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. SOLVENTES, REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Os solventes utilizados na otimização e validação da extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para análise de resíduos de carbamatos em amostras de café foram: acetonitrila (Mallinckrodt, HPLC), acetona (Vetec, HPLC); acetato de etila (Mallinckrodt, HPLC), diclorometano (Pró-Químicos, HPLC), hexano (Mallinckrodt, HPLC), e metanol (Mallinckrodt, HPLC).

Os principais reagentes utilizados na otimização da técnica foram: ácido clorídrico (Vetec - PA), hidróxido de sódio (Sigma - PA), cloreto de sódio (Reagen - PA), sulfato de sódio anidro (Vetec – PA), acetato de zinco (Reagen – PA), ferrocianeto de potássio (Carlo Erba – PA).

Foram utilizados também cartuchos contendo C₁₈, C₈ e SAX (Supelclean LC), adsorventes Florisil (Fluka), carvão ativado (Carlo Erba), sílica-gel (Merck, 0,063-0,2 mm).

Utilizou-se peagâmetro (Digimed DM 21), banho-ultrassônico (Unique, Maxi Clean 750), mesa agitadora (Tenal TE 420), vórtex (B. Braun Biotech International, Certomat MV), balança analítica (Sartorius EP 221S) e um cromatógrafo a líquido (Shimadzu LC20AT) equipado com detector UV-Vis (Shimadzu SPD 20A), forno da coluna (Shimadzu CTO 10ASVP), injetor automático (Shimadzu SIL 10AF) e sistema de integração (Shimadzu Lab Solutions). A coluna utilizada foi Coluna Phenomenex Luna 3u C₁₈, 100 A 150 x 4,6 mm.

4.2. PRINCÍPIOS ATIVOS

Foram utilizados padrões de aldicarbe (99,9% m/m – Riedel-de Hën) e carbofurano (99,9% m/m – Fluka Analytical) e os produtos comerciais Temik[®] 150 (BAYER S. A. - São Paulo - granulado) e Furadan[®] 100 G (FMC QUIMICA DO BRASIL LTDA. – Campinas - granulado), contendo os princípios ativos aldicarbe (150 g kg⁻¹) e carbofurano (100 g kg⁻¹), respectivamente.

4.2.1. Preparo de soluções padrão

Soluções estoque de 1.000,0 mg L⁻¹ foram preparadas para cada padrão, pela solubilização de quantidades adequadas dos princípios ativos aldicarbe e carbofurano em acetonitrila. A partir de diluição das soluções estoque, foi preparada, em acetonitrila, a solução padrão de trabalho contendo os dois princípios ativos em concentrações de 500,0 mg L⁻¹. As demais soluções foram obtidas a partir de diluições destas soluções.

Os princípios ativos aldicarbe e carbofurano foram extraídos dos produtos comerciais Temik (aldicarbe) e Furadan (carbofurano) empregando a metodologia modificada de Orlanda (2002). Para isto, 0,2000 g dos produtos comerciais Temik e Furadan foram submetidos à agitação mecânica, em mesa agitadora por 5 minutos, com 15,0 mL de acetona. Em seguida o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro (tomando-se o cuidado de não transferir junto os grânulos do produto) e a fase orgânica foi reservada. Essa etapa de extração foi repetida mais duas vezes. Em seguida, juntaram-se as três fases orgânicas evaporando-se o solvente até completa secura, em evaporador rotatório. Os resíduos foram quantitativamente recuperados em 10,0 mL de acetonitrila. O extrato foi analisado por CLAE-UV, para determinar a sua concentração. Foram obtidas para aldicarbe e carbofurano concentrações de 74,05 mg g⁻¹ e 54,50 mg g⁻¹, respectivamente. Em seguida, essa foi diluída para o preparo das soluções de trabalho.

Para o processo de otimização da técnica ELL-PBT as amostras de café bebida foram fortificadas com soluções dos princípios ativos aldicarbe e carbofurano em concentrações conhecidas preparadas a partir destes princípios ativos extraídos dos produtos comerciais. Para a etapa de validação,

foram utilizadas soluções de trabalho contendo os princípios ativos obtidos dos padrões puros.

4.3. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a líquido com coluna de fase reversa C₁₈ (octadecilsilica) e detector ultravioleta.

As seguintes condições cromatográficas foram otimizadas: proporção da fase móvel (água:acetonitrila), vazão da fase móvel, comprimento de onda de máxima absorção dos compostos e volume de injeção.

A quantificação dos princípios ativos aldicarbe e carbofurano foi realizada pelo método da padronização externa.

4.4. AMOSTRAS

Foram analisadas amostras de café bebida recém preparadas, fortificadas com quantidades conhecidas de aldicarbe e carbofurano para a otimização e validação da metodologia de análise dos agrotóxicos aldicarbe e carbofurano. Foram analisadas também amostras de café bebida preparadas a partir de um pó de café contaminado intencionalmente com aldicarbe e carbofurano. Foi avaliado o efeito da adição de açúcar e adoçante e a temperatura do café, na extração dos princípios ativos.

A estabilidade dos produtos comerciais na matriz foi avaliada por um período de 28 dias em presença e ausência de luz e açúcar e variando também a temperatura de armazenamento dessas amostras.

4.4.1. Preparo do café bebida

Para otimização e validação da extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura de aldicarbe e carbofurano em café bebida, foram adquiridas amostras de pó de café moído e empacotado no comércio de Viçosa.

O café bebida foi preparado conforme recomendações da Associação Brasileira da Indústria do Café (ABIC, 2009) para preparação em filtro de papel, isto é, 8 a 10 g de pó de café para 100 mL de água aquecida à temperatura

próxima da fervura. Assim, 8,0000 g de pó de café foram acondicionados em um filtro de papel apoiado em um suporte de plástico, e em seguida, foram adicionados 100,0 mL de água a 90 ± 3 °C. A bebida foi recolhida em béquer, fortificada e submetida à extração e análise.

4.4.2. Fortificação do café bebida

Após atingirem a temperatura ambiente, amostras do café bebida foram fortificadas com quantidades conhecidas dos princípios ativos aldicarbe e carbofurano.

Em testes preliminares, 4,0 mL da amostra de café bebida foram fortificados com 80,0 µL da solução padrão de trabalho contendo os dois inseticidas na concentração de 500,0 mg L⁻¹. Para a otimização univariada, planejamento fatorial e validação, foram 2,0 mL de amostras de café bebida foram fortificadas com 40,0 µL da solução padrão de trabalho contendo os dois agrotóxicos na concentração de 500,0 mg L⁻¹.

As amostras fortificadas foram agitadas em vórtex por 10 segundos e deixadas em repouso por aproximadamente 3 horas para que houvesse maior interação dos agrotóxicos com a amostra e também a evaporação do solvente. Posteriormente, estas amostras foram submetidas aos procedimentos de extração, para determinação das condições ótimas para análise dos agrotóxicos aldicarbe e carbofurano, por cromatografia líquida de alta eficiência.

4.5. OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA (ELL-PBT)

4.5.1. Testes preliminares

No processo de otimização da técnica ELL-PBT para análise dos agrotóxicos aldicarbe e carbofurano em bebida de café, por CLAE-UV, alguns testes preliminares como tempo de partição em freezer e volume de amostra e

de solvente necessários para uma boa porcentagem de recuperação dos analitos, foram realizados.

Nessa etapa a técnica ELL-PBT, consistiu em colocar a amostra em contato com solvente orgânico, de maneira a formar fase única, agitar por um determinado tempo e posteriormente levar a mistura ao freezer para separação das fases. Decorrido o tempo estabelecido, o extrato foi passado por um papel de filtro, previamente lavado com acetonitrila, contendo sulfato de sódio anidro. O extrato foi recuperado e aferido em balão volumétrico de 10,0 mL com acetonitrila e armazenado em frasco de vidro no freezer até o momento da análise cromatográfica.

A seguir, estão descritas as etapas realizadas no processo de otimização da técnica ELL-PBT, para análise dos resíduos de agrotóxicos em café bebida.

a) Tempo de partição em baixa temperatura

Inicialmente, foi testado o tempo ideal de partição em freezer, para a extração dos princípios ativos aldicarbe e carbofurano em café bebida. Quatro mililitros (4,00 mL) de café bebida fortificado foi colocado em contato com 8,00 mL de acetonitrila e agitado por 10 minutos em banho ultrassônico. Posteriormente, as amostras foram levadas ao freezer para separação das fases orgânicas e aquosas, por períodos que variaram de 1; 2; 3; 5; 10; 20, 25 e 28 horas. Decorrido o intervalo de tempo estipulado para as amostras particionarem, as mesmas foram filtradas conforme descrito acima.

b) Volume de amostra e de solvente extrator

Outro parâmetro avaliado foi o volume de amostra e solvente extrator a ser utilizado no preparo de amostras.

Os volumes de amostra e de acetonitrila testados foram 2,0 mL de amostra / 4,0 mL de acetonitrila e 4,0 mL de amostra / 8,0 mL de acetonitrila.

4.5.2. Otimização univariada

O estudo univariado foi realizado para auxiliar na escolha das variáveis e na especificação dos níveis em que cada fator seria estudado, na realização do planejamento fatorial completo.

Assim, em frasco de vidro transparente com tampa e septo de Teflon®, de 22,0 mL de capacidade, foram adicionados 2,0 mL de café bebida fortificados com padrões dos dois carbamatos em concentração de 10,0 mg L⁻¹ e 4,0 mL de solvente extrator. Essa solução foi mantida em agitação e levada ao freezer a -20 ± 5 °C por 3 horas para separação das fases. Após esse período, a fase orgânica foi retirada e armazenada em frasco de vidro em freezer até o momento da análise cromatográfica.

As variáveis analisadas e as etapas realizadas no processo de otimização da técnica ELL-PBT, para análise dos resíduos de agrotóxicos em café bebida foram: modo e tempo de agitação, solvente extrator, tempo de fortificação, pH e força iônica da amostra.

4.5.2.1. Modo e tempo de agitação

A Tabela 2 apresenta os modos e os tempos de agitação avaliados no procedimento descrito acima (4.4.2).

Tabela 2. Modo e tempo de agitação da mistura amostra:acetonitrila.

Modo de agitação	Tempo de agitação (minutos)
Sem agitação	-
Banho Ultrassônico (US)	5
Banho Ultrassônico (US)	10
Banho Ultrassônico (US)	20
Agitação mecânica (AM)	5
Agitação mecânica (AM)	30
Vórtex	0,5
Vórtex	1

4.5.2.2. Solvente extrator

Outro parâmetro que também foi avaliado na otimização da ELL-PBT para a extração dos princípios ativos de café bebida foi o solvente extrator. As amostras foram preparadas conforme procedimento descrito no item 4.4.2, adotando-se o modo e tempo de agitação estabelecido no item 4.4.2.1.

Foram testados acetonitrila (ACN), acetato de etila (AE), diclorometano (DCM), metanol (MeOH), e as misturas acetonitrila:acetato de etila (ACN:AE) (6,5:1,5, v/v), hexano:diclorometano (HEX:DCM) (90:10, v/v) e hexano:diclorometano (HEX:DCM) (85:15, v/v) como solventes extratores.

As respostas utilizadas para avaliar o melhor solvente extrator foram as porcentagens de recuperação médias obtidas para cada um dos agrotóxicos após os ensaios de extração realizados em triplicatas com as diferentes misturas extratoras.

4.5.2.3. Tempo de fortificação

Esse estudo foi realizado para avaliar o efeito do tempo de fortificação na eficiência de extração. Assim, amostras de café bebida fortificadas com os dois agrotóxicos a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ foram mantidas em repouso sob condições ambientais (20-24 °C) por 0; 0,5; 1; 3; 5; 8; 12; 24; 32 e 48 horas.

Decorrido o intervalo de tempo estipulado para o repouso das amostras, estas foram submetidas à etapa de extração empregando as condições analíticas otimizadas anteriormente (solvente extrator e modo e tempo de agitação).

4.5.2.4. Efeito do pH da amostra

Avaliou-se também o efeito do pH da amostra na eficiência de extração dos analitos. O estudo foi realizado ajustando-se o pH das amostras de café bebida em valores que variaram de 2,2 a 12,0, incluindo o pH da amostra sem ajuste, cujo valor é 5,50. O pH do meio foi ajustado com soluções de ácido clorídrico e de hidróxido de sódio.

Amostras de 10,0 mL de café bebida tiveram os seus valores de pH ajustados para: 2,2; 3,0; 4,0; 8,0; 10,0 e 12,0. Em seguida, alíquotas de 2,0 mL das amostras foram fortificadas a 10,0 mg L⁻¹ e colocadas em contato com 4,0 mL de acetonitrila. A extração foi realizada nas condições analíticas otimizadas anteriormente. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.5.2.5. Força iônica

A influência da força iônica na taxa de recuperação dos compostos em café bebida foi avaliada pela adição de NaCl nas amostras. A estas amostras foram adicionadas quantidades suficientes de NaCl para se obter uma concentração de 0,02 mol L⁻¹ e 0,10 mol L⁻¹. A mistura foi agitada em vórtex por 10 segundos para homogeneização, e em seguida, foram adicionados 4,0 mL de acetonitrila, seguindo os procedimentos já otimizados previamente.

4.5.3. Planejamento fatorial 2²

Realizou-se um planejamento fatorial 2² para estudar o comportamento simultâneo de dois fatores: (1) Força iônica e (2) pH da amostra. Cada um dos fatores foi avaliado em dois níveis, nível máximo (+) e nível mínimo (-), conforme representado na matriz de planejamento da Tabela 3, para as amostras de café bebida fortificadas com aldicarbe e carbofurano a 10 mg L⁻¹.

Os níveis dos dois fatores utilizados no planejamento fatorial foram estabelecidos em experimentos prévios (otimização univariada). A adição de sal foi utilizada no nível máximo que permitia ainda a existência de uma fase única entre os solventes, água e acetonitrila.

Como se trata de um experimento 2² foram realizados 4 ensaios com uma repetição, totalizando 8 ensaios.

Em frasco de vidro transparente com tampa de polietileno, de 22 mL de capacidade foram adicionados 2,0 mL de bebida café e 0 g ou 0,0600 g de NaCl, correspondente aos níveis (-) e (+) do fator 1, respectivamente. Em seguida, ajustou-se o valor do pH das amostras conforme o nível (-) do fator 2 da Tabela 3, sendo o nível (+) equivalente ao pH da amostra. Posteriormente, as amostras foram fortificadas com 40,0 µL de aldicarbe e carbofurano (500,0

mg L⁻¹) e agitadas por 10 segundos em vórtex. Foram adicionados 4,0 mL de acetonitrila. A extração foi realizada nas condições otimizadas previamente (tempo de partição em freezer e tempo e modo de agitação). Os extratos foram mantidos em frascos de vidro, em freezer, até o momento da análise cromatográfica.

Tabela 3. Planejamento fatorial 2² para as amostras de café bebida fortificadas com aldicarbe e carbofurano (10,0 mg/L).

Ensaio	Fatores Codificados		Fatores originais	
	Fator (1)	Fator (2)	(1) Força iônica (mol L ⁻¹ NaCl)	(2) pH
1 e 1R	-	-	0,000	3,0
2 e 2R	+	-	0,512	3,0
3 e 3R	-	+	0,000	5,5
4 e 4R	+	+	0,512	5,5

As melhores condições do planejamento foram avaliadas em função das porcentagens de extração obtidas em cada ensaio. Esses dados foram tratados empregando o programa Excel[®] da Microsoft.

4.6. EFICIÊNCIA DA ETAPA DE *CLEAN-UP* DOS EXTRATOS DE CAFÉ BEBIDA NA ELL-PBT

Os extratos orgânicos obtidos da ELL-PBT otimizada para extração de carbamatos em amostras de café bebida foram submetidos a uma etapa de *clean-up* para melhorar a qualidade dos mesmos com vistas à análise cromatográfica.

4.6.1. *Clean-up* com carvão ativado e florisil

Utilizando a técnica otimizada, após a partição a frio da mistura, a fase orgânica líquida foi retirada e filtrada em papel de filtro contendo uma camada de adsorvente (0,7500 g). Os extratos foram recuperados para 5,0 mL em

acetonitrila e armazenados no freezer até o momento da análise cromatográfica. Os adsorventes avaliados foram florisil e carvão ativado.

Também foi avaliado o *clean-up* dos extratos com adição do florisil e carvão ativado (1,0000 g) diretamente na mistura da amostra com a fase extratora, antes da etapa de agitação.

O *clean-up* dos extratos foi avaliado pelas características dos cromatogramas (ruídos da linha de base e picos interferentes) e pela porcentagem de extração dos agrotóxicos.

4.6.2. Extração em fase sólida

Extração em fase sólida empregando cartuchos C₁₈ (6 mL), C₈ (6 mL) e SAX (3 mL), (cloreto de trimetil-propil-amônio-sílica) como adsorventes e acetonitrila como eluente foram avaliados na etapa de *clean-up* dos extratos de café bebida. Após a partição a frio, 3,7 mL da fase orgânica foram transferidos para os cartuchos contendo os diferentes adsorventes previamente condicionados com 4,0 mL de água destilada e 4,0 mL de acetonitrila. Essa fase orgânica foi recolhida em balões volumétricos de 5,0 mL, e em seguida aferida com acetonitrila. Foi empregado para esse estudo um sistema a vácuo (Visiprep, Supelco). Os extratos foram analisados por CLAE-UV.

4.6.3. *Clean-up* em cartuchos de florisil, sílica e carvão ativado

Cartuchos de florisil, sílica e carvão ativado foram preparados colocando 1,5000 g de cada um dos adsorventes em cartuchos de polietileno (10,0 mL) contendo papel de filtro em sua extremidade inferior. Esses cartuchos foram ativados com 1,0 mL de acetonitrila.

O extrato orgânico (3,7 mL) contendo os analitos foi transferido para esses cartuchos, e recolhido em balão volumétrico de 5,0 mL. Após ajustar o volume, os mesmos foram armazenados em freezer até a análise cromatográfica.

4.6.4. Permeação em Gel

A cromatografia de permeação em gel também foi avaliada na purificação de extratos de café bebida contendo aldicarbe e carbofurano.

Para isso, foi utilizado colunas de vidro (20 cm de altura e 2 cm de diâmetro) contendo 2,0000 g de sílica-gel preparada em acetonitrila. O extrato orgânico (3,7 mL) foi transferido para essa coluna. Alguns extratos foram eluídos com 16,0 mL de acetonitrila e outros com 16,0 mL de fase móvel H₂O:ACN (65:35, v/v). Os mesmos foram recolhidos e armazenados em frasco de vidro em freezer até o momento da análise cromatográfica. Esse teste foi realizado em duplicata.

4.6.5. Soluções clarificadoras: Reagente de Carrez

O uso de soluções clarificadoras de extratos e matrizes com muita cor também é muito citado em análises envolvendo extratos de café bebida (MONTEIRO e TRUGO, 2005; DE MARIA e MOREIRA, 2004; NOGUEIRA e TRUGO, 2003). Por isso, elaborou-se um estudo utilizando os reagentes de Carrez (ferrocianeto de potássio 6,0% m/v e acetato de zinco 12% m/v) para avaliar o efeito desses na clarificação das amostras de café bebida. Esses reagentes foram adicionados à amostra (café bebida) antes da fortificação (CAF); após a fortificação (CDF); e aos extratos obtidos após a partição em baixa temperatura (CE).

Inicialmente foram preparadas soluções denominadas de reagente de Carrez com adição de quantidades suficientes de ferrocianeto de potássio e acetato de zinco para preparar 5,0 mL dessas soluções a 6,0% m/v e 12,0% m/v, respectivamente.

Em seguida, amostras de café bebida preparadas como descrito no item 4.3.1 foram submetidas aos testes de clarificação descritos abaixo.

a) Clarificação de café bebida antes da fortificação (CAF)

Retirou-se uma alíquota de 10,0 mL de café bebida à temperatura ambiente, adicionou 0,2 mL dos reagentes de Carrez, agitou e deixou em repouso por 15 minutos. Em seguida a amostra foi filtrada em papel de filtro, fortificada com aldicarbe e carbofurano a 10,0 mg L⁻¹ e submetida a metodologia ELL-PBT otimizada.

b) Clarificação de café bebida depois da fortificação (CDF)

Após a etapa de fortificação das amostras de café bebida, foram adicionados 40,0 μL dos reagentes de Carrez para clarificação das mesmas (simulando a clarificação de amostras reais, que já se encontram contaminadas). Em seguida, essas amostras foram agitadas e deixadas em repouso por 15 minutos, para precipitação de componentes do café e clarificação do mesmo. Essas foram posteriormente filtradas, e submetidas à metodologia ELL-PBT otimizada.

c) Clarificação de extratos de café após ELL-PBT (CE)

Aos extratos de café bebida obtidos pelo método ELL-PBT foram adicionados 80,0 μL dos reagentes de Carrez para clarificação dos mesmos. Esses foram homogeneizados e deixados em repouso por 15 minutos. Em seguida, foram filtrados em papel de filtro e armazenados em frascos de vidro (vial) até o momento da análise cromatográfica.

4.7. COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

A eficiência da partição pela diminuição temperatura para extração de aldicarbe e carbofurano em amostras de café bebida foi comparada à partição pelo efeito *Salting-out* (partição entre as fases orgânicas e aquosas por adição de solução salina).

As amostras de café bebida foram preparadas e fortificadas. Para a partição em baixa temperatura (PBT), a metodologia otimizada foi utilizada. Já a partição por “*salting-out*”, seguiu a técnica otimizada até a homogeneização do solvente extrator com a amostra, resultando em fase única. Posteriormente, para o rompimento do equilíbrio líquido-líquido foi utilizado 0,5 mL de solução de NaCl 3 mol L⁻¹ (já que em testes preliminares essa foi a maior concentração que possibilitou uma boa separação entre as fases orgânicas e aquosa, com menor volume de solução aquosa adicionado, buscando não variar muito a proporção amostra solvente extrator). Após homogeneização da mistura, essa

foi deixada em repouso em temperatura ambiente, por 3 horas. Em seguida, recolheu-se 1,0 mL do extrato orgânico para análise por CLAE-UV. Foram preparadas 7 replicatas de cada um.

A comparação dos resultados foi realizada utilizando o teste de diferenças entre médias populacionais com auxílio do programa ORIGIN[®].

4.8. VALIDAÇÃO

Na etapa de validação foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos: seletividade; linearidade; precisão (repetibilidade); limite de detecção e limite de quantificação. E os procedimentos realizados para a validação do método proposto e otimizado, foram baseados em recomendações do ICH (2005), RIBANI et al. (2004), ANVISA (2003b), INMETRO (2003) e outras publicações.

4.8.1. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas dos extratos obtidos após a extração de amostras de café bebida isenta dos inseticidas aldicarbe e carbofurano com os cromatogramas dos extratos obtidos da matriz fortificada. Ambas amostras foram submetidas ao procedimento de extração otimizado.

4.8.2. Linearidade de resposta do detector

A linearidade de resposta do detector UV foi verificada pela injeção de padrões dos agrotóxicos em acetonitrila em concentrações crescentes: 0,025; 0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 2,00; 5,00; 10,00; 25,00; 50,00; 100,00 e 250,00 mg L⁻¹.

Após a análise cromatográfica, foram construídas curvas analíticas, relacionando as áreas com as concentrações dos analitos. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação determinado pela regressão linear, calculados com auxílio do programa Excel (Microsoft Office 2007).

4.8.3. Limite de detecção e limite de quantificação do equipamento

O LD do aparelho, menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado foi determinado injetando soluções padrão contendo aldicarbe e carbofurano nas concentrações 1,00; 0,50; 0,10; 0,05 e 0,025 mg L⁻¹. O LD do aparelho foi considerado como a concentração que forneceu uma área três vezes a área do ruído do solvente, no t_R dos analitos. O LQ, menor concentração do analito que pode ser quantificada, foi determinado como a concentração que forneceu uma área dez vezes o ruído.

4.8.4. Linearidade do método

Amostras de café bebida foram fortificadas com os princípios ativos e submetidas a metodologia otimizada para obtenção de extratos nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 2,00; 5,00; 10,00; 25,00; 50,00; 100,00 e 250,00 mg L⁻¹.

Avaliou-se a linearidade pelo coeficiente de correlação (r) obtido da curva analítica.

A faixa de trabalho utilizada foi de 0,10 a 25,0 mg L⁻¹. Para essa faixa, a avaliação da linearidade foi pela construção da curva analítica pelo método da superposição de matriz e determinou-se o coeficiente de correlação (r).

4.8.5. Limite de detecção e quantificação do método

Para o estudo da determinação dos valores de LD e LQ do método, foram realizadas várias injeções dos extratos, de matrizes de café bebida fortificadas em concentrações decrescentes, 2,00; 1,00; 0,50; 0,10 e 0,05 mg L⁻¹. Foram realizadas injeções de soluções diluídas da mistura dos padrões em baixas concentrações no extrato orgânico da matriz próximas ao 1º ponto da curva de calibração até a obtenção de picos que resultassem em sinais gráficos com a razão sinal-ruído 3:1 e 10:1, correspondendo aos limites de detecção e quantificação, respectivamente.

4.8.6. Precisão

A precisão do método de extração líquido-líquido e partição em baixa temperatura e análise por cromatografia líquida de alta eficiência foi verificada sob condições de repetitividade.

A repetitividade do método de extração dos agrotóxicos aldicarbe e carbofurano em amostras de café bebida foi determinada, conforme sugerido pelo INMETRO, realizando-se sete extrações idênticas dos agrotóxicos, segundo a metodologia otimizada, avaliando-se o desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV).

4.9. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ

Para verificação do possível efeito da matriz no método proposto nesse trabalho, foram construídas duas curvas analíticas. A primeira curva analítica foi construída com os agrotóxicos aldicarbe e carbofurano diluídos em acetonitrila. A outra curva foi construída pela injeção de padrões preparados em extratos orgânicos obtidos de uma matriz, com todos os interferentes e co-extrativos do café bebida.

As concentrações das soluções padrão preparadas para construção das curvas analíticas foram de 100,0; 50,0; 25,0; 10,0; 5,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,1; 0,05 e 0,025 mg L⁻¹.

Após a análise das soluções padrão preparadas em acetonitrila e no extrato orgânico por CLAE-UV, foram construídas duas curvas analíticas para cada princípio ativo. O efeito de matriz foi avaliado comparando os parâmetros (coeficiente angular) das equações de reta obtidas pela regressão linear das curvas analíticas.

4.10. APLICAÇÃO DA METODOLOGIA OTIMIZADA EM DIFERENTES AMOSTRAS DE CAFÉ BEBIDA

A técnica ELL-PBT otimizada para determinação de aldicarbe e carbofurano em café bebida foi aplicada em diferentes amostras com os seguintes objetivos:

- Avaliar a influência da presença de açúcar e adoçante em café bebida na determinação dos carbamatos;
- Avaliar a influência da temperatura do café bebida na eficiência de extração de aldicarbe e carbofurano;
- Avaliar a influência do preparo da bebida de café empregando um pó de café fortificado com padrões dos princípios ativos;
- Avaliar a estabilidade dos produtos comerciais (Temik e Furadan) nessa matriz, em diferentes temperaturas, com e sem açúcar e em presença e ausência de luz.

4.10.1. Influência da presença de açúcar e adoçante na determinação dos agrotóxicos

As amostras de café bebida foram preparadas e fortificadas de acordo como os itens 4.3.1.

A quantidade de açúcar utilizada para adoçar o café foi correspondente à proporção caseira normalmente utilizada. A medida caseira corresponde a duas colheres (sopa) de açúcar (31,25 g) para um copo de água (250 mL).

A quantidade de adoçante utilizada foi utilizada conforme recomendações no rótulo do produto, isto é, 6 gotas/100 mL.

Assim, as diferentes amostras de café bebida (sem doce, com açúcar ou com adoçante) foram submetidas ao método ELL-PBT e analisadas por CLAE-UV.

4.10.2. Influência da temperatura do café bebida durante a fortificação na eficiência de extração de aldicarbe e carbofurano

Nesse estudo, a influência da temperatura do café bebida na etapa de fortificação foi avaliada pela eficiência de extração dos carbamatos aplicando a metodologia otimizada.

Dessa maneira, as amostras de café bebida foram preparadas de acordo com o item 4.3.1. Três amostras foram fortificadas (10,0 mg L⁻¹) logo após o preparo do café bebida (83 ± 3 °C) e outras foram fortificadas após as mesmas atingirem a temperatura ambiente (35 ± 3 °C).

4.10.3. Influência do preparo da bebida de café sobre os níveis de agrotóxicos

Esse estudo teve como objetivo avaliar a transferência de resíduos de carbamatos presente no pó de café para o café bebida, já que o café é submetido a um processo de infusão antes do consumo humano.

Para isso, 3,2000 g de pó de café foi fortificado com 0,8 mL da solução padrão contendo os princípios ativos aldicarbe e carbofurano a 500,0 mg L⁻¹, homogeneizado e deixado em repouso a temperatura ambiente por 1 hora para evaporação do solvente e interação dos analitos com o pó de café.

Em seguida, preparou-se o café bebida, conforme descrito no item 4.3.1, utilizando o pó de café fortificado e aplicou a metodologia otimizada. Os resultados obtidos foram comparados aos da extração do café bebida fortificados com os agrotóxicos na mesma concentração (10,0 mg L⁻¹).

De posse dos resultados, viu-se a necessidade, porém de aplicar essa técnica otimizada na determinação de resíduos desses princípios ativos remanescentes na borra de café. Para isso, 1,0000 g de amostra de borra de café acrescida de 1,0 mL de água destilada foi submetida ao processo de extração ELL-PBT. Porém, após retirar as amostras do freezer, retirou-se a fase orgânica e diluiu para 10,0 mL, completando o volume com acetona. Em seguida, retirou-se 1,0 mL para análise por cromatografia líquida. As análises foram realizadas em triplicata.

4.10.4. Avaliação da estabilidade dos produtos comerciais em café bebida

Um estudo da degradação de aldicarbe e carbofurano foi realizado em café bebida, armazenando as amostras por um período de 28 dias, em três temperaturas (-20, 4 e 22° C), na presença e ausência de açúcar (12,5%) e em presença ou ausência de luz.

A determinação dos carbamatos foi realizada pela metodologia otimizada.

O café bebida foi preparado como descrito no item 4.3.1 e após atingir a temperatura ambiente, 50,0 mL de café bebida foi fortificado com os produtos comerciais Temik e Furadan (80 mg L⁻¹ e 600 mg L⁻¹, respectivamente).

Antes da fortificação, foi adicionado 12,5% m/v de açúcar em 23 amostras para verificar se o açúcar interfere na degradação dos princípios ativos aldicarbe e carbofurano.

Em seguida, 36 amostras de café bebida (6,0 mL) foram armazenadas em freezer (-20 ± 3 °C), quatro (50,0 mL) em geladeira (4 ± 3 °C), e 6 (50,0 mL) à temperatura ambiente (22 ± 5 °C). Nesse último foi verificado também o efeito da presença e ausência de luz, deixando 3 amostras sob o efeito de uma lâmpada incandescente de intensidade 60 W, e 3 amostras foram então armazenadas em frascos de vidro âmbar cobertos com papel alumínio para impedir a passagem de luz.

As extrações foram realizadas após 1, 12 e 24 horas e também após 3, 5, 10, 15, 21 e 28 dias após a aplicação dos produtos comerciais em café bebida.

O resultado obtido para a amostra submetida ao processo de extração no primeiro dia (tempo zero) foi considerado 100%. E a porcentagem de degradação foi verificada comparando os outros valores a esse.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

As condições cromatográficas otimizadas que permitiram a separação adequada dos agrotóxicos aldicarbe e carbofurano em um tempo relativamente curto foram: fase móvel: água:acetonitrila (65:35, v/v); vazão da fase móvel: 0,8 mL min⁻¹; temperatura da coluna: 30 °C e volume de injeção 20,0 µL. O comprimento de onda (λ) que permitiu a máxima absorção dos compostos aldicarbe e carbofurano foi 195 nm.

O detector ultravioleta apresenta sensibilidade aos carbamatos, já que os mesmos possuem elétrons π e grupos carbonila que absorvem a radiação ultravioleta. A identificação dos compostos estudados foi realizada por comparação entre os tempos de retenção (t_R) destes nos extratos com os da solução padrão.

Um cromatograma de uma solução padrão contendo os agrotóxicos aldicarbe e carbofurano na concentração de 5,0 mg L⁻¹ e um cromatograma dos extratos após a ELL-PBT obtido a partir de amostras de café bebida fortificadas com os agrotóxicos aldicarbe e carbofurano é apresentado na Figura 6. O tempo total de análise foi 16 minutos.

Observa-se nos primeiros minutos de análise, antes do t_R do aldicarbe, ao comparar os cromatogramas da amostra fortificada (Figura 6b) com o da solução padrão dos agrotóxicos (Figura 6a), a presença de muitos picos. Isso indica a complexidade da matriz café bebida (BANDEIRA et al., 2009; RIBEIRO et al.; 2009; ZAMBONIN et al., 2005; MOREIRA et al., 2000), que apresenta muitos compostos que absorvem a radiação ultravioleta.

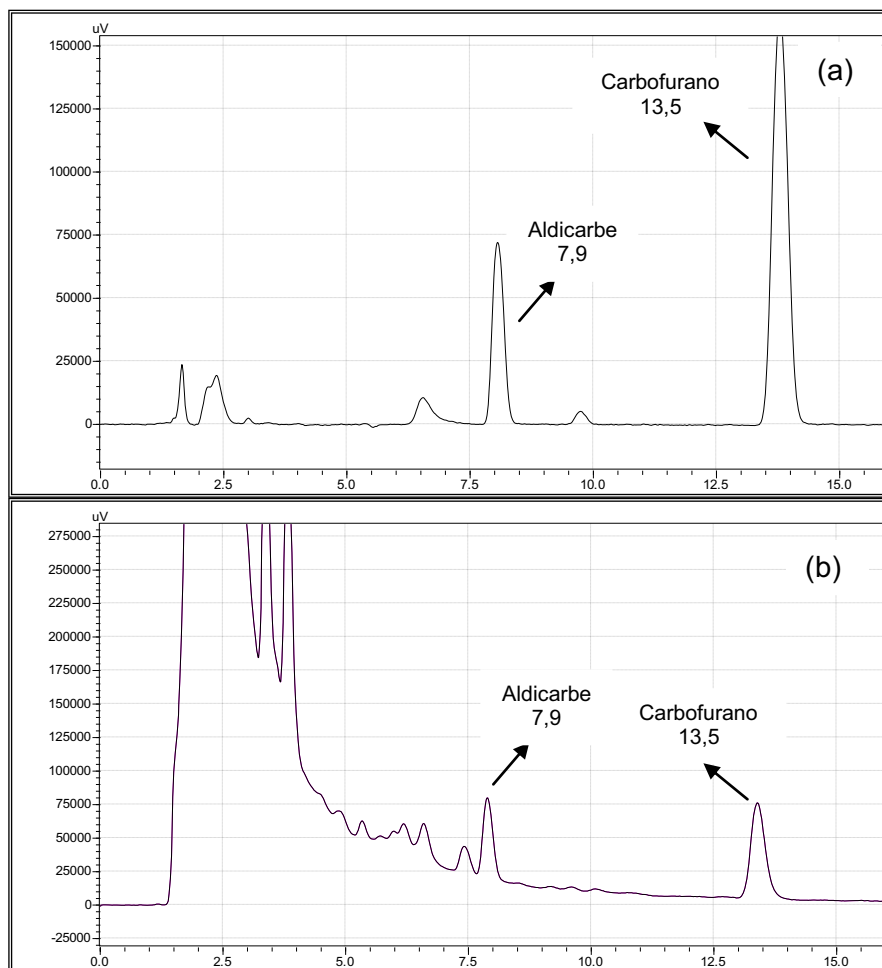


Figura 6. Cromatograma de (a) uma solução padrão a 5,0 mg L⁻¹ contendo os agrotóxicos em acetonitrila; (b) amostra fortificada a 10,0 mg L⁻¹ e submetida a ELL-PBT, onde: $t_R = 7,9$ min: Aldicarbe e $t_R = 13,5$ min: carbofurano.

5.2. OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA (ELL-PBT)

Tendo em vista os excelentes resultados apresentados pela ESL-PBT e ELL-PBT em matrizes sólidas e líquidas, respectivamente (GOULART, 2004; VIEIRA, 2005; DARDENGO, 2007; PINHO, 2007; VIEIRA et al, 2007; BITTENCOURT, 2008; GOULART et al., 2008; PUSSENTE, 2008; SILVA, 2008; PINHO, 2009), essa mostrou ser uma técnica ideal para ser utilizada na determinação de agrotóxicos (aldicarbe e carbofurano) em café bebida, uma

vez que foi desenvolvida para simplificar a etapa de *clean-up*, e tem se mostrado simples, rápida e de fácil execução.

Esta consiste em adicionar à amostra contendo os analitos de interesse uma quantidade de solvente orgânico miscível em água, formando uma fase única, para que com o abaixamento da temperatura a aproximadamente -20 °C ocorra a separação das fases, em que café bebida (fase aquosa) congele na parte inferior do recipiente utilizado e o solvente contendo os resíduos de agrotóxicos extraídos permaneçam na parte superior. Durante o estudo da técnica, alguns fatores como: mistura extratora ideal, tempo de extração e tipo de agitação, força iônica e pH da amostra, foram avaliados. Os resultados obtidos serão descritos a seguir.

5.2.1. Testes preliminares

Os recentes trabalhos que utilizaram a técnica ESL-PBT e ELL-PBT (GOULART, 2004; VIEIRA, 2005; DARDENGO, 2007; PINHO, 2007; VIEIRA et al, 2007; BITTENCOURT, 2008; GOULART et al., 2008; PUSSENTE, 2008; SILVA, 2008; PINHO, 2009) realizaram a extração e *clean-up* por abaixamento da temperatura deixando as amostras no freezer até que a fase aquosa juntamente com os interferentes se congelassem, eliminando praticamente toda água do extrato, uma vez que a quantificação dos resíduos de agrotóxicos era feita por cromatografia gasosa.

Como nesse trabalho a determinação de aldicarbe e carbofurano em café bebida, a quantificação é feita por CLAE-UV, foram realizados estudos para verificar a necessidade do congelamento das amostras durante a partição por abaixamento da temperatura. Também foram realizados estudos no sentido de diminuir o consumo de amostra e solventes orgânicos. Os resultados são apresentados abaixo.

a) Tempo de partição a frio

A separação das fases pelo abaixamento da temperatura ocorre em virtude da diminuição da solubilidade dos solventes orgânicos em meio aquoso. Foi verificado que essa separação de fases entre acetonitrila e água (fase aquosa do café) ocorreu 30 minutos após a mistura ser colocada no freezer a

uma temperatura de cerca de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Já o congelamento da fase aquosa foi verificado entre 5-7 horas. Acreditando que a distribuição do analito entre as fases aquosas e orgânicas ocorra predominantemente antes do congelamento da fase aquosa, procurou-se quantificar essa transferência do analito em função do tempo de partição a frio. Os resultados obtidos pelo estudo do tempo de partição a frio são apresentados na Figura 7.

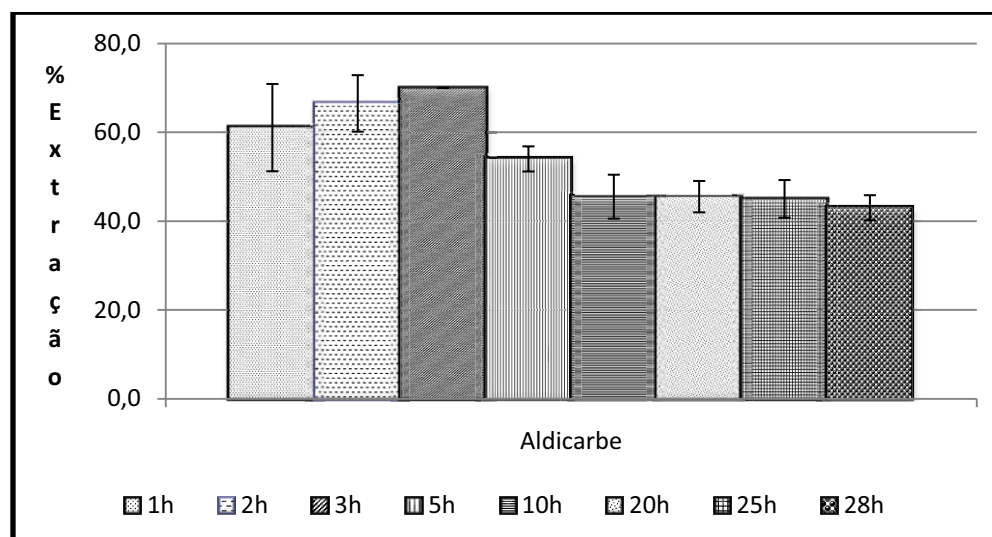


Figura 7. Porcentagem de extração do aldicarbe usando a técnica ELL-PBT em amostra de café bebida variando o tempo de partição em baixa temperatura.

Como pode-se observar, de 1 até 3 horas, são obtidas as melhores porcentagens de extração de aldicarbe, sendo que esses valores não são diferentes significativamente a 95% de confiança pelo teste t de Student. A partir de 5 horas, houve uma redução na porcentagem de extração do analito, e após 10 horas o sistema entrou em equilíbrio, uma vez que não foram verificadas diferenças significativas ao nível de 95% de confiança pelo teste t de Student, nesse decaimento.

A diminuição da temperatura reduz a solubilidade do solvente orgânico em meio aquoso, favorecendo assim a separação de fases aquosa e orgânica. E nessa separação de fases, o solvente orgânico arrasta o analito. Porém, com o congelamento da fase aquosa, uma quantidade do analito pode estar ficando retida na fase aquosa, de maneira a diminuir a porcentagem de extração do aldicarbe.

Vale ressaltar também que após 10 horas, não foi verificada redução dos co-extrativos da matriz extraídos junto com o analito, evidenciando que para a

etapa de *clean-up* não foi necessário um grande tempo de partição em baixa temperatura.

Sendo assim, durante os testes da otimização univariada, foi utilizado o tempo de 3 horas para partição a frio, já que este é tempo suficiente para que ocorra uma boa partição entre a amostra e o solvente extrator e também para o *clean-up* da amostra.

Esse teste foi realizado apenas para o aldicarbe, e o melhor resultado foi aplicado para o carbofurano. A resposta obtida para o mesmo foi satisfatória, permitindo-se assim utilizar o tempo de 3 horas em freezer para a partição das fases em baixa temperatura.

b) Volume de amostra e de solvente extrator

Com o objetivo de reduzir a quantidade de amostra e solvente orgânico consumidos no preparo de amostras, realizou-se um estudo para ver se a redução de ambos à metade afetaria a eficiência do método. Os resultados desse estudo são apresentados na Figura 8.

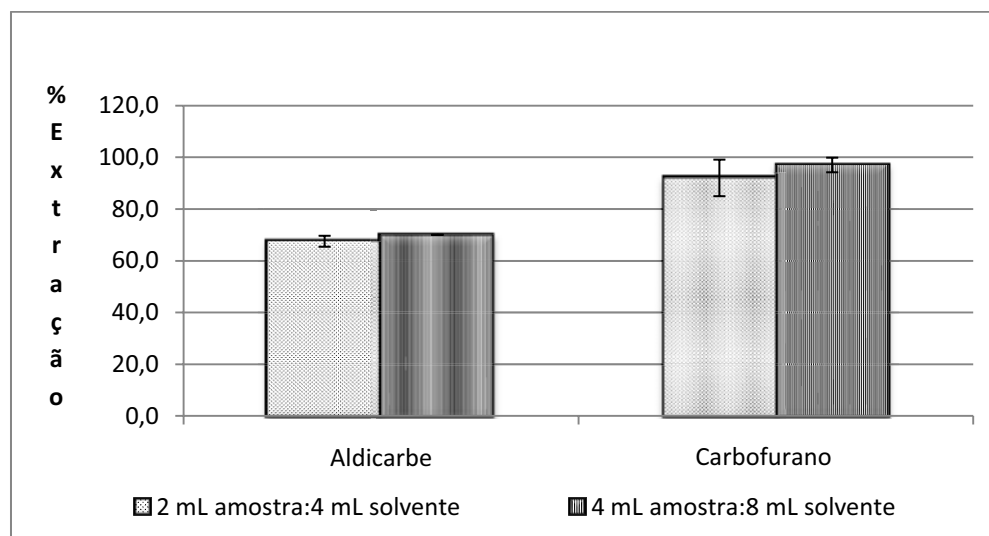


Figura 8. Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano em função da quantidade de amostra e solvente extrator (acetoneitrila).

Como pode-se verificar, não há diferença significativa na porcentagem de extração dos analitos ao reduzir o volume de amostra e de solvente extrator. Isso foi comprovado ao nível de 95% de confiança pelo teste t de Student. Significando que o importante é a proporção e não as quantidades de amostras.

Assim, na execução dos próximos passos do trabalho foram utilizados 2,0 mL de amostra e 4,0 mL de acetonitrila.

Observa-se que a porcentagem de extração do carbofurano é maior que a porcentagem de extração do aldicarbe. Essa diferença significativa na eficiência de extração está relacionada à solubilidade desses princípios ativos em água. Pelos dados apresentados na Tabela 1, o aldicarbe por ser mais solúvel em meio aquoso, apresenta um caráter mais polar que o carbofurano. Assim, durante a extração com acetonitrila, solvente orgânico, o carbofurano apresentou melhor eficiência de extração que o aldicarbe.

Vale destacar também, que esses testes iniciais foram importantes, pois permitiram a modificação da metodologia ELL-PBT, técnica descrita para a extração de deltametrina e cipermetrina em leite (GOULART, 2004, GOULART et al., 2008), para extração de quatro piretroides em água e solo (VIEIRA, 2005; VIEIRA et al., 2007), e para análise de tomate (PINHO, 2007), batata (DARDENGO, 2007; BITTENCOURT, 2008), carne bovina (SILVA, 2008), maçã (PUSSENTE, 2008) e mel (PINHO, 2009). Essa modificação foi possível, uma vez que, para a determinação de aldicarbe e carbofurano por cromatografia líquida, não é necessário o congelamento da fase aquosa, já que a mesma não afeta esse sistema cromatográfico. Com isso, as amostras permanecem menos tempo no freezer, correspondendo apenas ao tempo necessário para que ocorresse uma boa separação de fases e boa distribuição dos analitos na fase orgânica, reduzindo assim, o tempo de preparo de amostras. Além disso, elimina-se a etapa de filtração dos extratos orgânicos em funis contendo papel de filtro com sulfato de sódio, que além de ser trabalhosa, pode levar a perda do analito.

5.2.2. Otimização univariada

5.2.2.1. Modo e tempo de agitação

A etapa de agitação das amostras é um dos fatores relevantes no processo de otimização de uma técnica, pois é nessa etapa que ocorre maior interação dos solventes com os analitos que estão sendo extraídos. Além disso, alguns trabalhos tem mostrado que o tipo e o tempo de agitação da mistura pode afetar a eficiência de extração (VIEIRA et al., 2007; GOULART et al., 2008).

Assim com o objetivo de verificar se o modo de agitação e o tempo de agitação afetariam a porcentagem de extração dos carbamatos em café bebida, um estudo foi realizado utilizando vórtex, mesa agitadora e banho ultrassônico em diferentes tempos de agitação. Os resultados obtidos nesse estudo são apresentados na Figura 9.

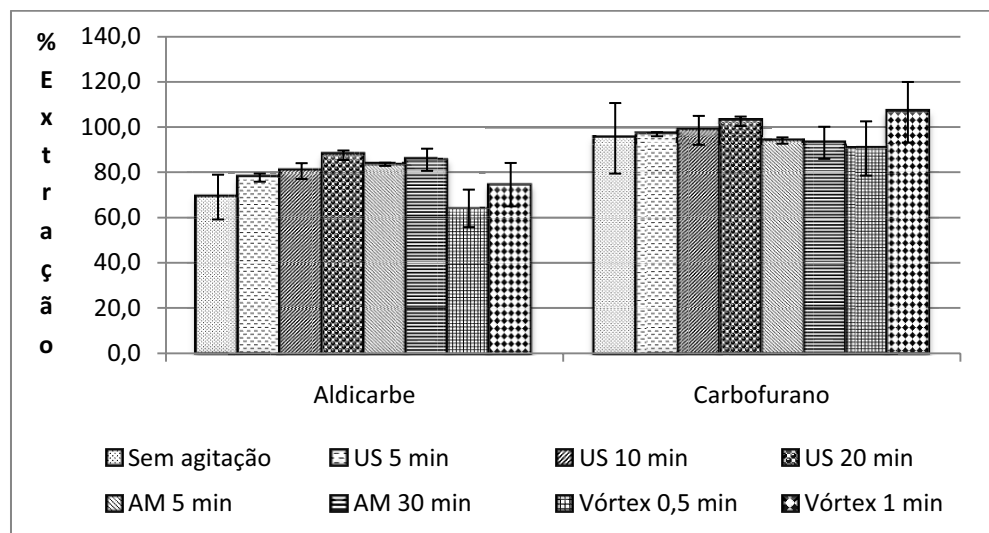


Figura 9. Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano em café bebida utilizando diferentes modo e tempo de agitação. (US) agitação em banho ultrassônico; (AM) agitação mecânica em mesa agitadora.

Pelos resultados obtidos, percebe-se que a não agitação da mistura, a agitação em vórtex por 30 segundos forneceram as menores respostas com maiores desvios-padrão.

Já a agitação em banho ultrassônico, à medida que aumentou o tempo de agitação, aumentou-se a eficiência de extração.

A agitação mecânica nos tempos de 5 e 30 minutos não apresentaram diferenças significativas ao nível de 95% de confiança pelo teste t de Student.

Assim, comparando os resultados obtidos com a agitação mecânica por 5 minutos com os da agitação em banho ultrassônico por 20 minutos, percebe-se também que não há diferença significativa ao nível de 95% de confiança pelo teste t de Student.

Portanto, optou-se por trabalhar com agitação mecânica por 5 minutos, tendo em vista as boas porcentagens de extração obtidas e com pequenos desvios nas respostas. Além do mais, esse menor tempo de agitação, diminui o tempo gasto com o preparo de amostras, favorecendo ainda mais para que o

método que está sendo otimizado seja um método rápido e de excelente frequência analítica.

Observa-se também que a eficiência de extração do aldicarbe é menor que a do carbofurano. Isso está relacionado à polaridade e miscibilidade dos compostos em meio aquoso. O aldicarbe por ser mais solúvel em água que o carbofurano (Tabela 1), apresenta um caráter mais polar que este. Com a adição do solvente orgânico, o carbofurano que tem um caráter menos polar é mais eficientemente extraído para a fase orgânica.

5.2.2.2. Solvente extrator

Muitos estudos de análise de resíduos de agrotóxicos têm sido descritos utilizando diferentes solventes ou mistura de solventes na etapa de extração, aplicados em diferentes matrizes.

Os solventes orgânicos mais empregados na extração de resíduos de agrotóxicos de alimentos têm sido acetona, acetonitrila, acetato de etila e metanol (DÍEZ et al., 2006). Maštovská e Lehotay (2004) citam os três primeiros como os mais empregados em análises multirresíduo.

Para extração de clorpirifós, diclorvós e paration metílico de café bebida e de borra de café foi utilizado a mistura hexano: diclorometano (85:15, v/v) (OLIVEIRA et al., 2002).

Os resultados obtidos pela avaliação dos diferentes solventes extratores testados são apresentados na Figura 10.

Pelos resultados obtidos, optou-se pela escolha da acetonitrila como solvente extrator, uma vez que todos os outros solventes testados, mesmo com boas porcentagens de recuperação, apresentaram algumas desvantagens.

O acetato de etila (AE) por apresentar um tempo de retenção próximo ao aldicarbe, impediu a quantificação desse, tanto em solvente puro, quanto na mistura com acetonitrila. Segundo Hercegová et al. (2007) esse solvente tem polaridade suficiente para extrair pesticidas polares.

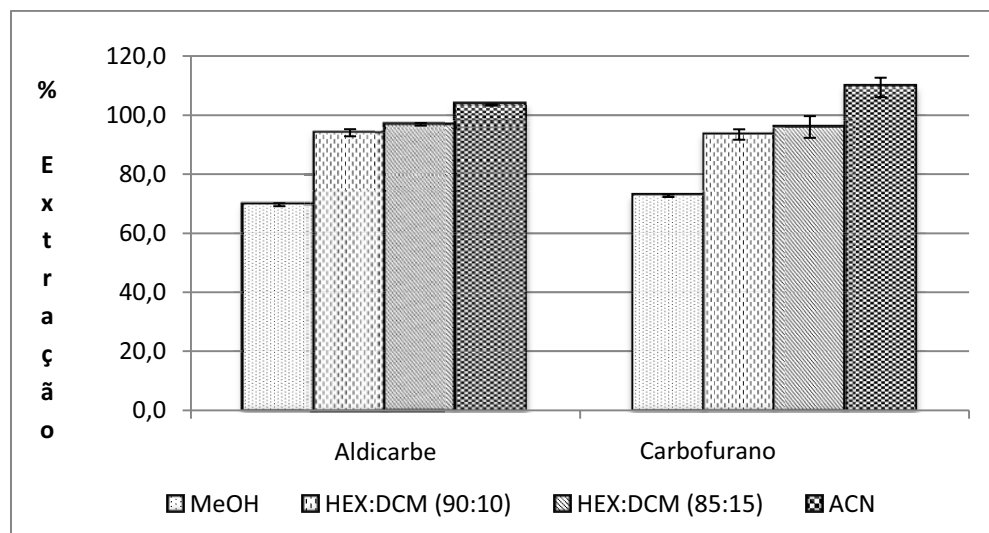


Figura 10. Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano em café bebida utilizando diferentes solventes extratores.

O DCM por apresentar tempo de retenção próximo ao carbofurano, impediu a quantificação desse, quando utilizado como solvente puro. O mesmo ocasionou uma perturbação ao sistema cromatográfico, elevando a linha de base. Vale destacar também, que o mesmo é mais denso que a amostra, sendo assim, após partição a frio, os analitos ficaram retidos na parte inferior dos frascos de vidro utilizado para o preparo das amostras.

O MeOH formou fase única ao ser adicionado à amostra, porém, após partição a frio, o metanol continuou em fase única, em virtude da alta solubilidade em meio aquoso.

As misturas Hex:DCM nas proporções 85:15 e 90:10 formaram um sistema bifásico com meio aquoso. Além disso, formaram emulsão na interface das fases orgânicas e aquosas, não sendo conveniente o uso das mesmas para ELL-PBT. E durante as análises, perturbaram muito o sistema cromatográfico, ocasionando a subida da linha de base e formando alguns picos de base mais largas.

Vale ressaltar também que Goulart et al. (2008) utilizaram acetonitrila para extrair dois piretroides de amostras de leite, obtendo ótimas porcentagens de extração, sendo essas melhores quando a proporção amostra:acetonitrila 1:2, v/v foi utilizada.

5.2.2.3. Tempo de fortificação

Fortificação da matriz corresponde ao processo de adição das soluções dos agrotóxicos em concentrações conhecidas à matriz isenta de resíduo, definida como amostra testemunha. Assim, como esse procedimento pode não reproduzir na íntegra a amostra com os analitos quimicamente ligados aos constituintes da matriz, deve-se levar em conta no processo de fortificação, o tempo de interação dos agrotóxicos na matriz (IMOTO, 2004).

Não existem dados concretos quanto ao intervalo de tempo necessário entre a fortificação de matriz e a extração dos analitos. Imoto (2004) utilizou o tempo de 3 horas entre a fortificação de agrotóxicos em maçãs e a extração.

Nesse estudo foram avaliados os intervalos de 0 a 48 horas entre a aplicação da solução padrão dos dois agrotóxicos aldicarbe e carbofurano à amostra de café bebida e a realização da extração. Os resultados das análises são apresentados na Figura 11.

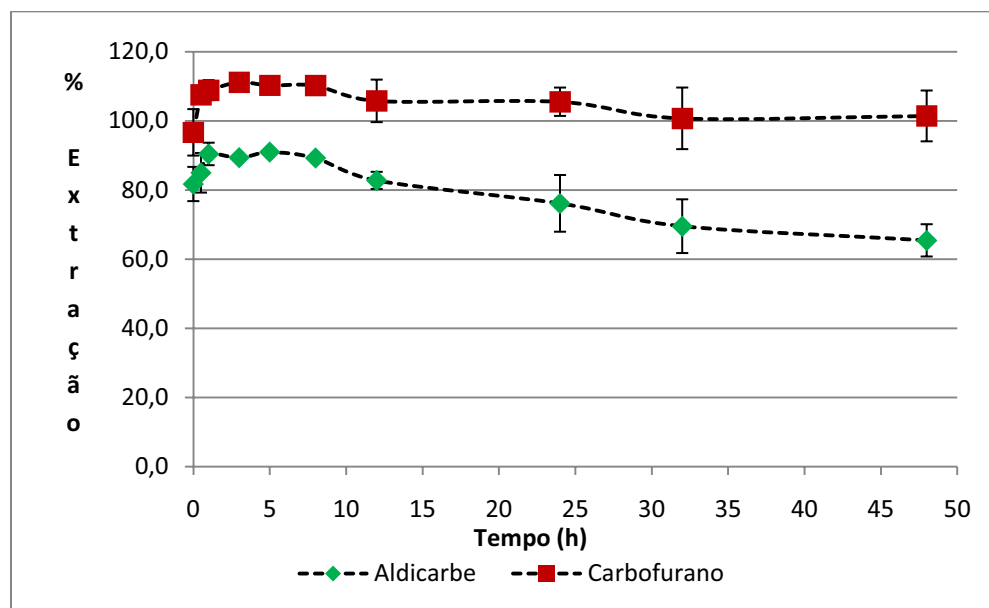


Figura 11. Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano de amostras de café bebida fortificadas com os agrotóxicos em função do tempo de contato com a matriz.

Observa-se que de 1 hora a 8 horas as porcentagens de extração dos analitos não alteraram significativamente.

Após 12 horas de contato entre os analitos e a amostra, percebe-se que à medida que aumenta o tempo de contato, diminui-se a porcentagem de recuperação. Essa diminuição da porcentagem de extração pode estar relacionada à precipitação dos componentes do café que aumentou em função

do tempo. Provavelmente alguns desses componentes podem estar interagindo com os analitos e impossibilitando que os mesmos passem para a fase orgânica, diminuindo conseqüentemente a eficiência da extração.

Como não foi observada diferença significativa na eficácia de extração nas primeiras 8 horas, optou-se por deixar os analitos em contato com a amostra por 1 hora.

5.2.2.4. Efeito do pH da amostra

Esse estudo buscou avaliar a estabilidade dos princípios ativos em função do pH da amostra e o efeito deste na eficiência da extração dos princípios ativos. Segundo Galli et al. (2006) os carbamatos são instáveis em condições neutras e alcalinas, à temperatura ambiente.

A mudança do pH da amostra mudará a forma ionizada de certos analitos e isto poderá afetar sua solubilidade e eficiência de extração (LAMBROPOULOU e ALBANIS, 2005).

A derivatização (reação com 4-aminoantipireno para formar compostos coloridos, após hidrólise) para determinar quatro carbamatos em grãos por extração em ponto nuvem seguida de CLAE-UV/VIS foi utilizada por Zhou et al. (2009). Esses derivados foram extraídos com maior eficiência em pH acima de 9,0.

Vale ressaltar que café bebida apresentou um valor de pH equivalente a 5,50. Os outros valores foram ajustados com soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio. Os resultados desse estudo são apresentados na Figura 12.

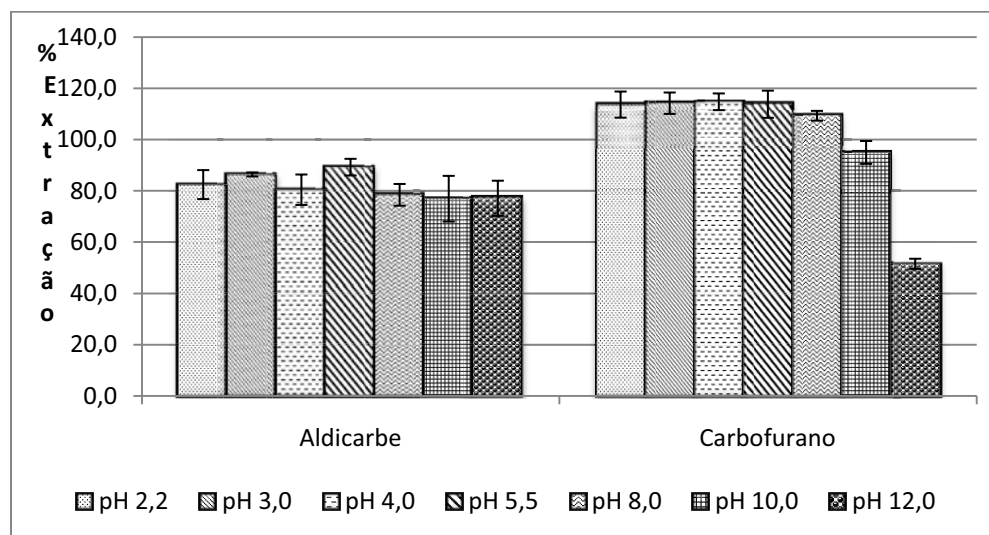


Figura 12. Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano em café bebida em diferentes valores de pH da amostra.

De modo geral, uma variação do pH da amostra não afeta a extração de aldicarbe e carbofurano, sendo observada uma diminuição da porcentagem de extração em meio alcalino (pH 10,0 e 12,0) principalmente para o carbofurano. A porcentagem de extração dos compostos é fortemente influenciada pelo pKa dos compostos. O aldicarbe que apresenta um pKa próximo 2,9 (KRUIVE et al., 2008) não sofre muita influência do pH da amostra durante a extração, uma vez que, o mesmo encontra-se na forma ionizada. Estando na forma ionizada, a porcentagem de extração do aldicarbe é menor que se tivesse na forma não ionizada, uma vez que a forma ionizada, por apresentar um caráter mais polar, é mais solúvel em fase aquosa. Para o carbofurano, como o pKa do mesmo é próximo de 11,9 (PRZYBYLSKI e BONNET, 2009), o mesmo permanece em sua forma protonada até pH 10,0, sendo extraído mais facilmente pelo solvente orgânico. Porém, a eficiência de extração do carbofurano, assim como nos outros testes já apresentados foi maior que a do aldicarbe, em virtude do caráter menos polar do carbofurano, como já discutido. Porém, como pode-se observar, em pH 12,0 a eficiência de extração do carbofurano diminuiu significativamente, em virtude do efeito de hidrólise. Tal efeito foi verificado também por Lambropoulou e Albanis (2005) ao estudarem o efeito da variação do valor de pH (2,5 a 8,5) na eficiência da extração de alguns agrotóxicos incluindo o carbofurano de amostras de água.

Esses mesmos autores observaram que para amostras de suco, o pH ideal para extração está em torno de 3,5-4 (LAMBROPOULOU e ALBANIS, 2002).

Assim, no preparo de amostras seguintes, não foi adotado no protocolo experimental, o ajuste do valor do pH da amostra, tendo em vista que o valor de 5,5, (valor usual do café bebida), forneceu porcentagens de recuperação aceitáveis. Dessa maneira, menos uma fonte de erros nos procedimento de preparo de amostras.

5.2.2.5. Força iônica

Os métodos de extração líquido-líquido utilizando acetonitrila, seguido de adição de sal à fase aquosa, permite uma separação eficiente do sistema homogêneo levando a um aumento das porcentagens de recuperação de compostos polares. A adição de sal ao sistema provoca uma redução da solubilidade do analito na matriz, facilitando a sua extração (HERCEGOVÁ et al., 2007).

Os resultados obtidos pelo estudo da força iônica influenciando a porcentagem de extração dos analitos são apresentados na Figura 13.

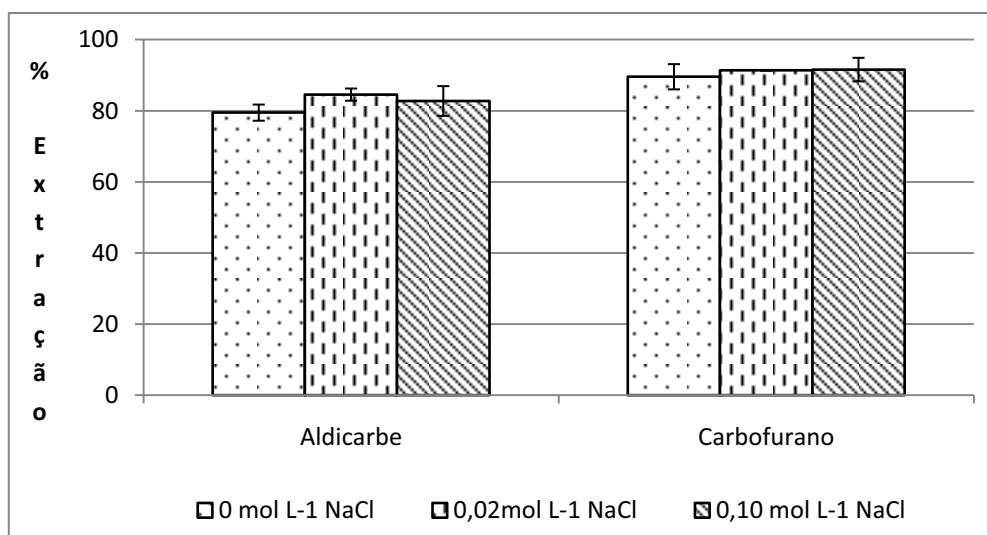


Figura 13. Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano em amostras de café bebida fortificadas com os agrotóxicos em função da força iônica utilizada.

Como pode-se perceber, o aumento da força iônica, não alterou significativamente a porcentagem de extração dos analitos. Isto pode se comprovado pelo teste t de Student ao nível de 95% de confiança.

Vieira et al. (2007) verificaram efeito negativo de adição de sal na extração de quatro piretroides de amostra de água. Segundo esses mesmos autores, o aumento da força iônica da solução aquosa pela adição de NaCl deveria provocar um efeito positivo devido à solvatação dos íons pelas moléculas de água, facilitando a migração dos piretroides para a fase orgânica. Porém, a adição de sal pode dificultar a formação de fase única, diminuindo a porcentagem de extração desses compostos.

Como a força iônica não alterou as porcentagens de recuperação dos analitos da maneira esperada, em teste posterior (otimização multivariada), será avaliado uma concentração salina maior, porém que não quebre o equilíbrio da fase única na ELL-PBT.

5.2.3. Planejamento fatorial 2²

O estudo univariado realizado previamente foi importante para auxiliar na escolha das variáveis e na especificação dos níveis em que cada fator seria estudado. Para estudar o efeito de qualquer fator sobre uma dada resposta é necessário fazê-lo variar de nível e observar o resultado que essa variação produz sobre a resposta. Para isso, precisa ter o fator em pelo menos dois níveis diferentes (BARROS NETO et al., 2007).

Em um planejamento fatorial são investigadas as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação na(s) resposta (s). Se a combinação de k fatores é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de 2^k experimentos. Planejamentos fatoriais de dois níveis permitem estimar apenas efeitos principais e interações (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

Assim, com o objetivo de verificar a existência de efeito de interação entre os fatores força iônica e pH da amostra na eficiência do método, foi realizado um planejamento fatorial 2². Vale ressaltar que foi utilizado uma maior concentração de NaCl (a concentração máxima que permitiu a formação de fase única entre a amostra e o solvente extrator, acetonitrila), já que quantidades menores não afetaram significativamente a porcentagem de extração.

Lambropoulou e Albanis (2005) verificaram que a máxima eficiência de extração para agrotóxicos com baixa ou moderada solubilidade em água foi

conseguida utilizando 5% m/v (0,512 mol L⁻¹) de NaCl. Enquanto que para os relativamente polares com alta solubilidade em água, a eficiência aumentou com o aumento da concentração salina para 15% m/v.

As porcentagens de recuperação obtidas em cada ensaio foram utilizadas para avaliar os efeitos de cada fator e de suas interações. Em negrito estão destacadas as melhores respostas obtidas para a extração dos carbamatos em estudo, às quais foram: força iônica em 0,512 mol L⁻¹ NaCl e pH da amostra equivalente a 5,5. Esses resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Porcentagens de recuperação média e o desvio padrão associado às respostas, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de bebida café.

Ensaio	Fatores Codificados		Recuperação (%) ± desvio padrão	
	F(1)	F(2)	Aldicarbe	Carbofurano
1 e 1R	-	-	95,0 ± 0,0	117,0 ± 1,4
2 e 2R	+	-	97,0 ± 1,4	118,5 ± 0,7
3 e 3R	-	+	94,0 ± 1,4	114,0 ± 0,0
4 e 4R	+	+	99,0 ± 1,4	114,5 ± 3,5

F(1) = Força Iônica e F (2) = pH

*(Em negrito) Melhor resposta médias obtida no planejamento fatorial

Com o auxílio do programa Excel[®] (Microsoft Office 2007) e das porcentagens de recuperação obtidas nos ensaios, foi possível calcular a recuperação média, os efeitos de cada fator e as interações entre os fatores na extração de cada um dos agrotóxicos. A Tabela 5 reúne todos estes resultados. Como os ensaios foram realizados em duplicata, pode-se estimar o erro experimental associado a cada efeito, e a partir daí avaliar a significância estatística dos fatores sobre a porcentagem de recuperação de cada agrotóxico. Para decidir se os efeitos calculados foram significativos, realizou o teste t de “Student” para $\alpha = 0,05$ e $\nu = 4$. Com 95% de confiança o valor de t correspondente a 4 graus de liberdade é 2,77645. Isso quer dizer que só foi considerado estatisticamente significativo, o efeito cujo valor de $t_{\text{calculado}}$ foi

maior que $t_4 \times \text{erro do efeito } (s_{ef}) = 2,776 \times 0,87\% = 2,415$. A Tabela 5 mostra, simplificada, os resultados desta análise estatística.

Tabela 5. Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (\pm estimativa do erro experimental) na extração de cada um dos agrotóxicos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de bebida café.

	Aldicarbe	Carbofurano
Recuperação Média	96,25 \pm 0,43	116,00 \pm 0,68
(1) Força Iônica	3,50 \pm 0,87	1,00 \pm 1,37
(2) pH	0,50 \pm 0,87	-3,50 \pm 1,37
(1) e (2)	1,50 \pm 0,87	-0,73 \pm 1,37

*(**Em negrito**) Efeito estatisticamente significativo com 95% de confiança pelo teste t de Student.

Para o aldicarbe foram significativos um efeito principal (força iônica) e a interação entre eles. Para o carbofurano, nenhum efeito com 95% de confiança foi significativo. Assim, como o efeito de interação é significativo, os efeitos principais devem ser interpretados conjuntamente. A melhor forma de fazer isso é traçar um diagrama contendo as respostas médias em todas as combinações de níveis das variáveis, como na Figura 14.

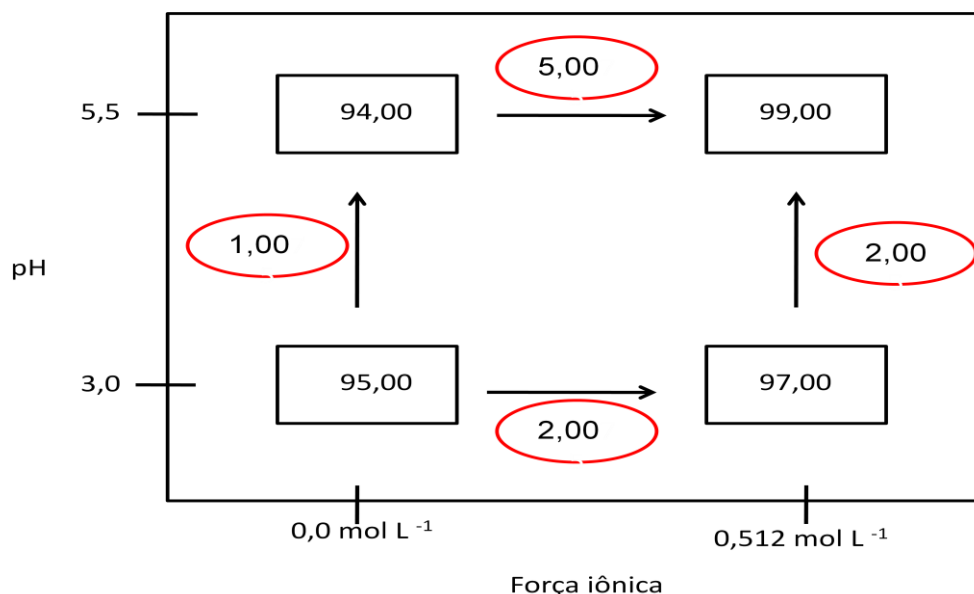


Figura 14. Diagrama para interpretação dos resultados significativos do planejamento fatorial 2^2 para o aldicarbe. Os valores nos vértices do quadrado são as respostas médias (rendimentos percentuais).

Examinando o diagrama, pode-se perceber que elevando a força iônica, aumentou o rendimento da extração, mas esse efeito é muito mais pronunciado em pH 5,5 do que em pH 3,0 (+5,00% contra +2,00%). Trocando o valor do pH da amostra de 3,0 por 5,5, aumenta o rendimento da extração, e esse efeito é mais significativo em uma amostra com força iônica $0,512 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl do que com força iônica nula (+2,00% contra 1,00%). Logo, tendo em vista o que foi apresentado, pode-se perceber que os maiores rendimentos (99,00%, em média) foram obtidos quando se utilizou uma força iônica equivalente a $0,512 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl (3,0% m/v) e pH da amostra igual a 5,5 (sem ajuste do valor do pH da amostra).

Porém, como a força iônica não alterou as taxas de recuperação dos analitos em café bebida da maneira esperada, este fator foi desprezado, tendo em vista que a adição de mais um reagente, aumenta mais uma etapa no preparo de amostras, e também os custos da mesma, podendo ser também mais uma fonte de erros.

5.3. METODOLOGIA OTIMIZADA

A metodologia otimizada para a análise de aldicarbe e carbofurano em amostras de café bebida pela técnica ELL-PBT consiste na extração de 2,0 mL da amostra com 4,0 mL de acetonitrila, sob agitação mecânica por 5 min. Essa mistura é levada posteriormente ao freezer a aproximadamente $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 h. Após esse período, retira-se 1,0 mL da fase orgânica e analisa-se o extrato por CLAE-UV.

A porcentagem de recuperação do método foi $94,5 \pm 6,0\%$ para o aldicarbe e $111,4 \pm 4,8\%$ para o carbofurano.

5.4. EFICIÊNCIA DA ETAPA DE *CLEAN-UP* DOS EXTRATOS DE CAFÉ BEBIDA NA ELL-PBT

O café é uma matriz complexa e os seus extratos apresentam quantidades apreciáveis de pigmentos. Utilizando o detector ultravioleta (UV), notou-se a presença destes compostos nos cromatogramas, mesmo com

resultados satisfatórios no processo de ELL-PBT dos agrotóxicos aldicarbe e carbofurano em café bebida.

Assim, para melhorar a qualidade dos extratos obtidos por ELL-PBT de amostras de café bebida, os mesmos foram submetidos a uma etapa adicional de *clean-up*.

5.4.1. *Clean-up* com carvão ativado e florisil

Com o objetivo de tornar os extratos mais puros avaliou-se o *clean-up* desses extratos pelo uso dos adsorventes florisil e carvão ativado, adicionando os mesmos, ora durante a partição em baixa temperatura, ora numa etapa de filtração da fase orgânica após retirar o extrato orgânico da partição em baixa temperatura. Tal processo deveria diminuir a quantidade de co-extrativos sem interferir significativamente na recuperação dos carbamatos.

As taxas de recuperação dos agrotóxicos na ELL-PBT, utilizando dois adsorventes no *clean-up* dos extratos comparados com padrões em acetonitrila, são mostradas na Figura 15.

Dos adsorventes testados, o carvão ativado foi o que proporcionou os extratos mais claros.

Observando a Figura 15, pode-se perceber que o florisil reduziu significativamente a porcentagem de extração do aldicarbe. O florisil apresenta caráter polar, logo, como o aldicarbe apresenta um caráter mais polar que o carbofurano, é mais solúvel que esse em meio aquoso (Tabela 1), o aldicarbe é mais retido pelo florisil que o carbofurano.

Os outros testes reduziram a taxa de recuperação do carbofurano, com exceção da filtração com florisil. Para o aldicarbe, a filtração com carvão ativado não afetou significativamente a recuperação do mesmo.

Porém, ao analisar os cromatogramas, nenhuma das etapas testadas eliminou os co-extrativos de interesse. Dessa maneira, optou-se por não utilizar essa etapa de *clean-up* no preparo das amostras.

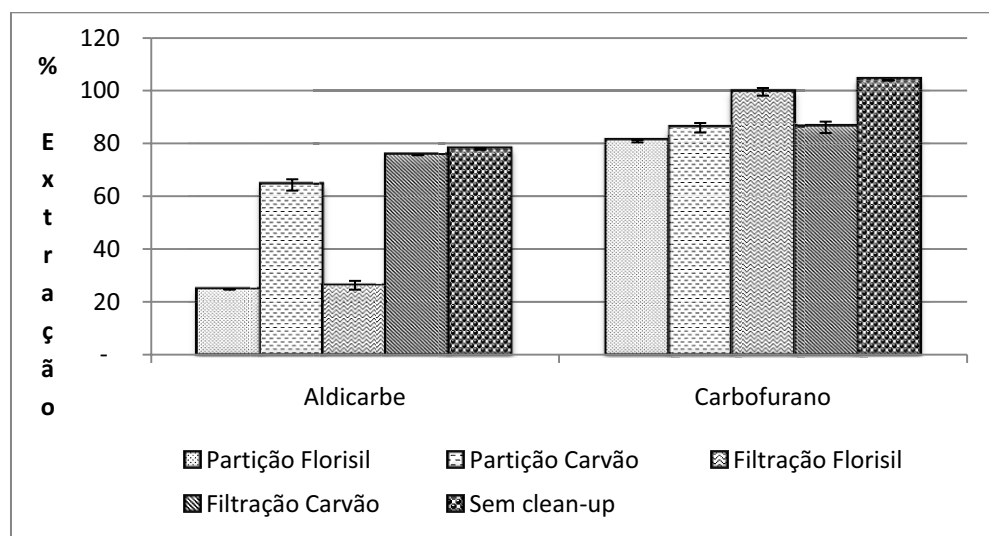


Figura 15. Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano após ELL-PBT e *clean-up* com florisil e carvão ativado.

5.4.2. Extração em fase sólida

A técnica extração em fase sólida tem sido muito utilizada para análise de resíduos de agrotóxicos em água e alimentos, pois, além de concentrar os analitos, simultaneamente realiza a etapa de *clean-up*.

A extração em fase sólida é muito utilizada na extração de agrotóxicos, incluindo aldicarbe e carbofurano de amostras de água (AGUILAR et al., 1999; PARREIRA et al., 2001; BORKOVCOVÁ et al., 2004)

Além disso, essa técnica pode ser empregada para remover co-extrativos de extratos (*clean-up* da amostra) (BORKOVCOVÁ et al., 2004).

Nesse trabalho, os adsorventes C₁₈, C₈ e SAX foram testados para a eliminação dos co-extrativos de extratos de café bebida na análise de carbamatos por cromatografia líquida. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 16.

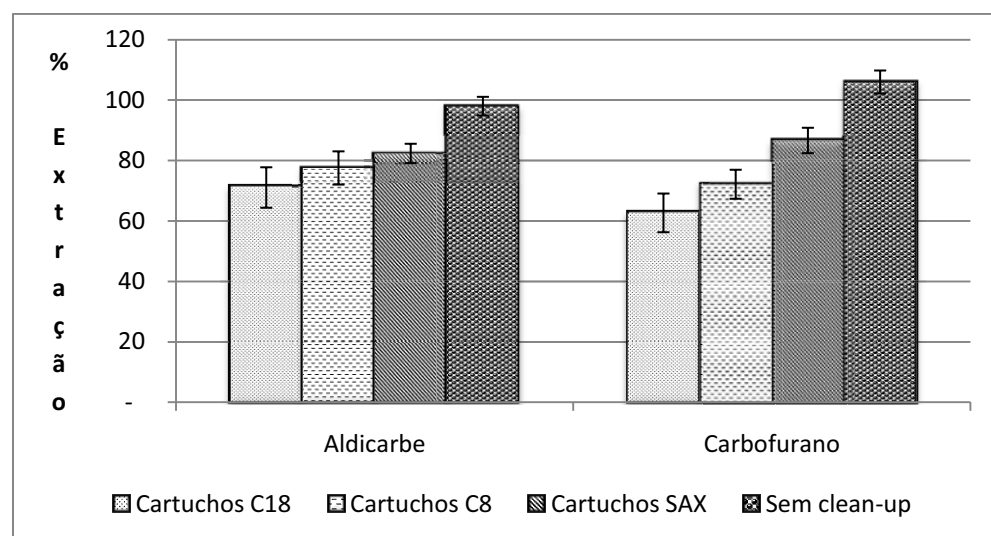


Figura 16. Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano após ELL-PBT e *clean-up* por extração em fase sólida.

Como se pode observar, a extração em fase sólida utilizando três adsorventes estudados reduziu significativamente a porcentagem de extração de aldicarbe e carbofurano.

Comparando os adsorventes testados, o SAX foi o que proporcionou os extratos mais claros e também o que forneceu as melhores taxas de recuperação. Porém, nem esse, nem C₁₈ e C₈ eliminaram os co-extrativos de interesse.

Dessa maneira, optou-se por não utilizar a EFS como *clean-up* dos extratos de café bebida, já que se aumentou mais uma etapa no preparo de amostras e conseqüentemente o consumo de solvente orgânico e não cumpriu os objetivos a que foi proposta.

5.4.3. *Clean-up* em cartuchos de florissil, sílica e carvão ativado

Um tubo de vidro contendo florissil para a limpeza dos extratos de café bebida e borra de café na determinação de diclorvós, clorpirifós e paration metílico foi utilizado por Oliveira et al. (2002).

Cartuchos preparados com os adsorventes sílica, florissil e carvão ativado foram testados para avaliar a eficiência desses na eliminação dos co-extrativos do café bebida (item 4.5.3). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 17.

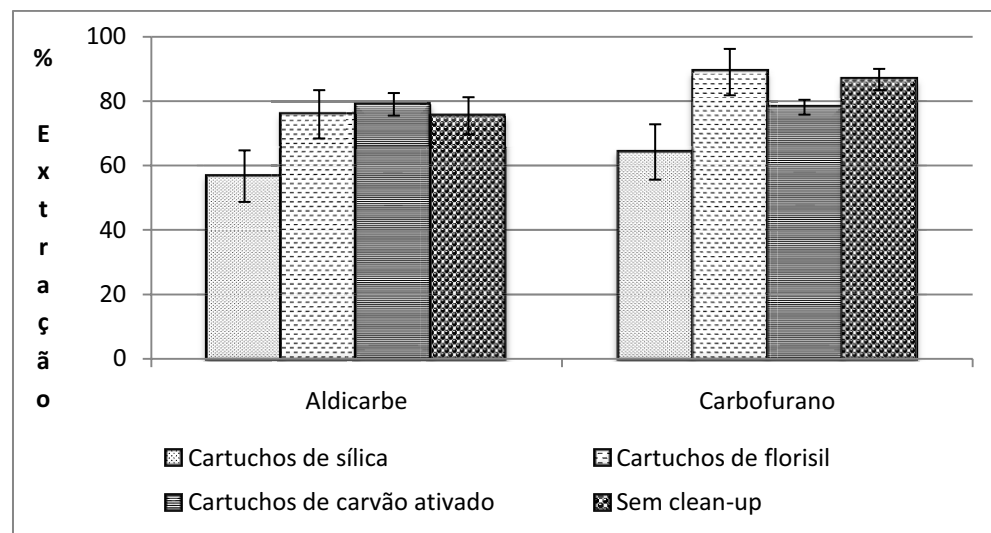


Figura 17. Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano em amostras de café bebida após ELL-PBT e *clean-up* em cartuchos de sílica, floril e carvão ativado das amostras de café bebida fortificadas.

O carvão ativado foi o adsorvente que forneceu os extratos mais claros, porém, vale ressaltar que a percolação dos extratos por esse adsorvente, por ser realizada à pressão atmosférica, foi muito lenta.

Os resultados apresentados na Figura 17 permitem concluir que a sílica reduziu significativamente a porcentagem de extração dos carbamatos. Já os adsorventes, floril e carvão ativado não apresentaram diferenças significativas na porcentagem de extração de aldicarbe, quando comparados às porcentagens obtidas de extratos que não foram submetidos à etapa de *clean-up*.

O carbofurano também apresentou porcentagens de recuperação reduzidas pelo carvão ativado, porém, apresentou porcentagens de recuperação ligeiramente maiores quando o floril foi utilizado como adsorvente.

Uma comparação entre os cromatogramas obtidos nesse estudo é apresentado na Figura 18.

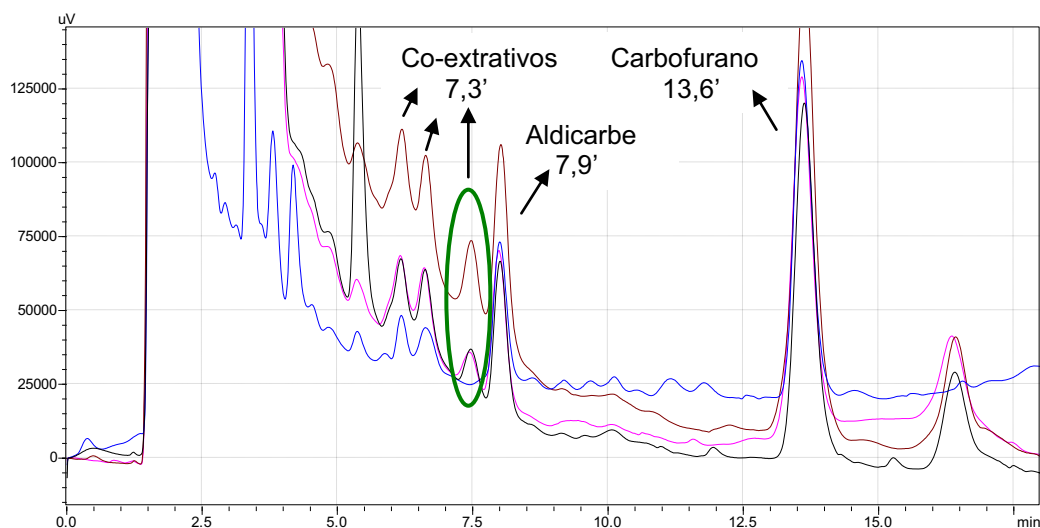


Figura 18. Comparação de cromatogramas de extratos de café obtidos por ELL-PBT e submetidos ao *clean-up*: linha azul – cartucho com 1,5000 g de carvão ativado; linha rosa – cartucho com 1,5000 g de florisil; linha preta – cartucho com 1,5000 g de sílica; linha vermelha – extrato sem etapa de *clean-up*.

Os cromatogramas apresentados permitem observar que o *clean-up* com carvão ativado (linha em azul) foi o único que eliminou o co-extrativo de t_R mais próximo ao do aldicarbe (realce em verde). Como o mesmo não eliminou outros interferentes de interesse, como o que sai no t_R do carbofurano, essa etapa de *clean-up* não foi adotada no protocolo experimental.

5.4.4. Permeação em Gel

A permeação em gel foi utilizada por Borkovcová et al. (2004) para remoção de compostos lipídicos de plantas na determinação de N-metilcarbamatos.

Diez-Rodríguez et al. (2006). utilizaram coluna cromatográfica de sílica-gel contendo 2 g desse adsorvente para determinar resíduos de aldicarbe em folhas de cafeeiro.

Outro método avaliado na purificação dos extratos de café bebida contendo os analitos aldicarbe e carbofurano nesse estudo foi a permeação em gel, cujos resultados são apresentados na Figura 19. Após serem transferidos para colunas de vidro contendo sílica-gel, alguns extratos foram eluídos com acetonitrila (PG-ACN) e outros com fase móvel $H_2O:ACN$ (65:35) (PG –FM).

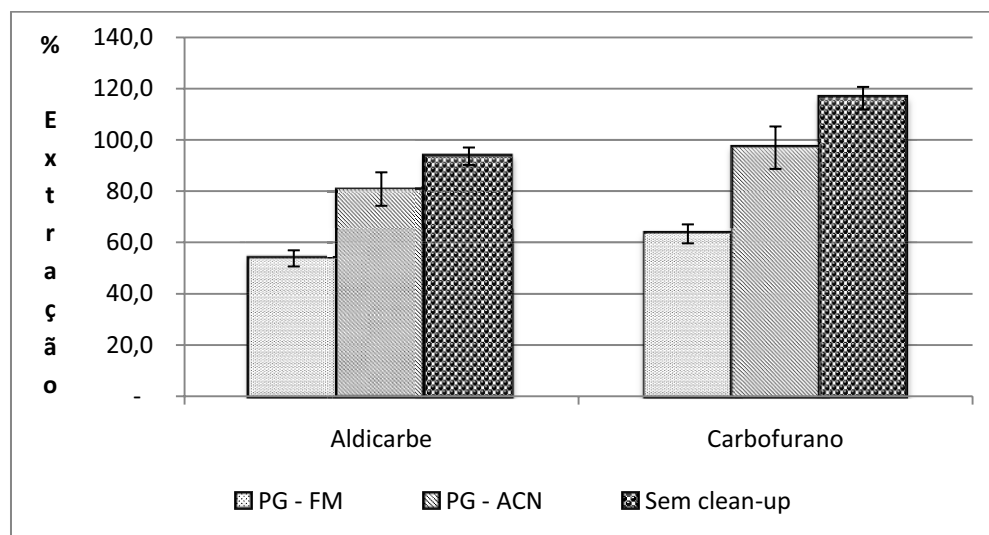


Figura 19. Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano após ELL-PBT e *clean-up* por permeação em gel. PG – ACN = permeação em gel e eluição com acetonitrila; PG – FM = permeação em gel e eluição com fase móvel.

As recuperações de aldicarbe e carbofurano em amostras de café bebida submetida à ELL-PBT e posterior *clean-up* por permeação em gel apresentaram-se menor que em extratos não purificados, provavelmente em virtude de perdas dos analitos retidos pelo adsorvente.

Pode-se perceber também que quando eluídos com fase móvel, a redução do solvente orgânico acetonitrila, diminuiu a porcentagem de extração de ambos os princípios ativos.

A Figura 20 apresenta os cromatogramas obtidos nesse teste. A linha em rosa representa os extratos da PG – FM, a azul PG – ACN, e a preta os extratos sem *clean-up*.

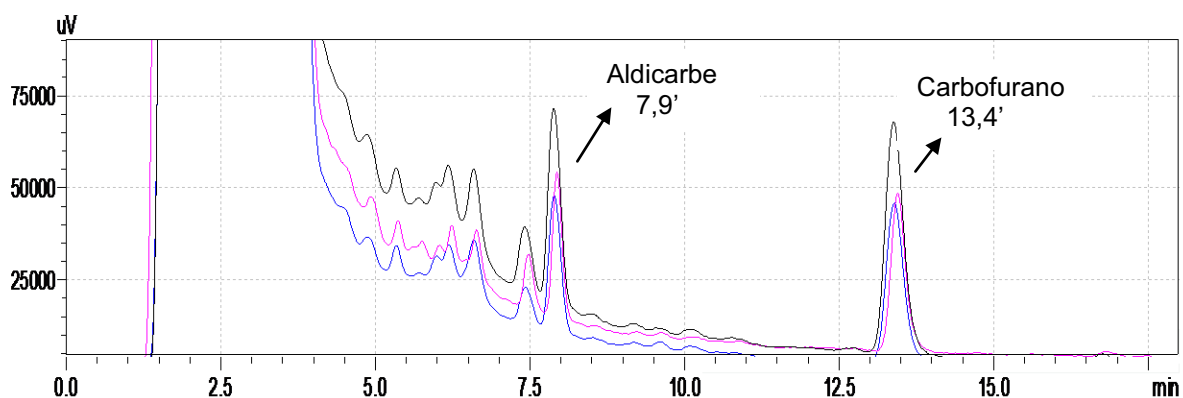


Figura 20. Comparação de cromatogramas de extratos de café obtidos por ELL-PBT e submetidos à permeação em gel: linha azul – PG – ACN; linha rosa – PG – FM; linha preta – extrato sem etapa de *clean-up*.

Assim, como se pode observar, a permeação em gel apresentou resultados pouco satisfatórios, uma vez que não eliminou os interferentes de interesse, apresentou consumo elevado de solvente, acetonitrila, além de aumentar muito o tempo de preparo de amostras. Por esses motivos, essa técnica não foi utilizada como etapa de *clean-up* dos extratos de café bebida.

5.4.5. Soluções clarificadoras: Reagente de Carrez

Vários pesquisadores utilizaram os reagentes de Carrez (acetato de zinco \cong 21% m/v e hexacianoferrato de potássio \cong 11% m/v) para clarificação de extratos de café na determinação de cafeína e ácidos clorogênicos (FARAH et al., 2006; MONTEIRO e TRUGO, 2005; DE MARIA e MOREIRA, 2004; NOGUEIRA e TRUGO, 2003).

O Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2004) utiliza ferrocianeto de potássio a 6% m/v e acetato de zinco a 12% m/v para determinação de glicídeos em café solúvel.

Nesse estudo foram utilizados os reagentes de Carrez (ferrocianeto de potássio a 6,0% m/v e acetato de zinco a 12,0% m/v) para clarificação de amostras de café (antes e depois da fortificação) e extratos de café obtidos por ELL-PBT. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 21.

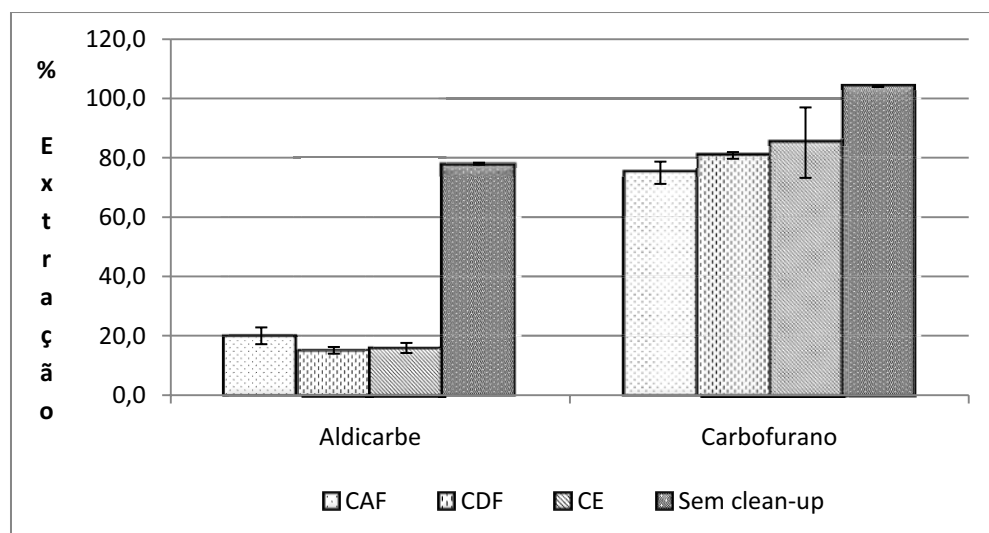


Figura 21. Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano obtidos após o teste de clarificação com reagentes de Carrez, onde:
 CAF = amostras clarificadas antes da fortificação;
 CDF = amostras clarificadas após fortificação;
 CE = extratos clarificados após PBT.

A utilização de reagentes de Carrez como clarificadores proporcionou amostras e conseqüentemente extratos bem mais claros. Porém, como pode-se observar na Figura 21, esses reagentes reduziram significativamente a porcentagem de extração de aldicarbe em ambos os testes. Em relação ao carbofurano, a porcentagem de extração foi significativamente menor para as amostras clarificadas após a fortificação (CDF) quando comparadas aos resultados das análises sem clean-up.

Após a adição do reagente de Carrez, verificou-se precipitação de componentes do café bebida, provavelmente pela adição de íons ferro que precipitou com a matéria orgânica e conseqüentemente arrastou os analitos, diminuindo a distribuição desses para a fase orgânica e conseqüentemente a extração.

Em virtude desses resultados insatisfatórios, o uso de clarificadores não foi adotado como etapa de *clean-up* na determinação de carbamatos em café bebida.

Tendo em vista que as metodologias propostas acima, para a purificação dos extratos de café bebida não apresentaram resultados satisfatórios, a etapa *clean-up* dos mesmos não foi inserida na metodologia otimizada, prevalecendo então para as análises seguintes apenas o descrito no item 5.3.

5.5. COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

A preparação da amostra é a essência de todo método analítico. Grande parte do tempo de uma análise é gasto no preparo da amostra. Assim, nesse trabalho procurou comparar duas técnicas de extração de aldicarbe e carbofurano em café bebida. A metodologia consistiu em adicionar um solvente extrator às amostras de café bebida fortificadas, numa proporção tal (1:2) que resultou em fase única. Para rompimento do equilíbrio líquido-líquido testou a redução da temperatura da mistura (PBT) e a adição de uma solução aquosa contendo um eletrólito forte de maneira a reduzir a miscibilidade do solvente orgânico em fase aquosa (*Salting-out*). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Porcentagens de recuperação (%R), desvio-padrão (s) e coeficiente de variação (CV) de cada método de partição

Carbamatos	ELL-PBT	Salting-out
	%R* \pm s; CV	%R* \pm s; CV
Aldicarbe	75 \pm 4,7; 6,2	63 \pm 1,6; 2,5
Carbofurano	102 \pm 5,6; 5,4	77 \pm 2,6; 3,4

*Recuperações médias equivalentes a sete repetições.

Esses resultados mostram que ambos os métodos de partição são precisos, apresentaram CV inferiores a 6,2%. Utilizou-se então o teste de diferenças entre médias populacionais para comparar as médias de duas distribuições normais com auxílio do programa ORIGIN[®]. A análise estatística mostrou que a 5% de significância, os dois métodos são significativamente diferentes.

Logo, tendo em vista o que foi apresentado, percebe-se que a partição em baixa temperatura apresentou melhor eficiência na extração de aldicarbe e carbofurano, mostrando-se assim apta a ser utilizada na extração de ambos em amostras de café bebida.

5.6. VALIDAÇÃO

Para avaliar o desempenho do método analítico, vários parâmetros foram considerados, segundo recomendações do ICH (2005), RIBANI et al. (2004), ANVISA (2003) e INMETRO (2003): seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão, robustez e efeito de matriz.

5.6.1. Seletividade

Para avaliar a seletividade do método de extração e análise por cromatografia compararam-se os cromatogramas dos extratos obtidos pela ELL-PBT de uma matriz de café bebida isenta dos agrotóxicos (Figura 22a) com o extrato de amostra de café bebida fortificada com os compostos em estudo (Figura 22b).

A amostra de café bebida, por possuir uma composição complexa, apresentou interferentes no mesmo tempo de retenção do carbofurano. Para o Aldicarbe a metodologia foi seletiva.

Um pequeno pico pode ser observado no tempo de retenção do carbofurano, no extrato obtido do café bebida isento de agrotóxicos. A resposta dessa área deverá ser compensada subtraindo a área obtida no extrato cuja amostra foi fortificada, pela área obtida no branco, uma vez que foi verificado que essa se manteve constante, durante o estudo.

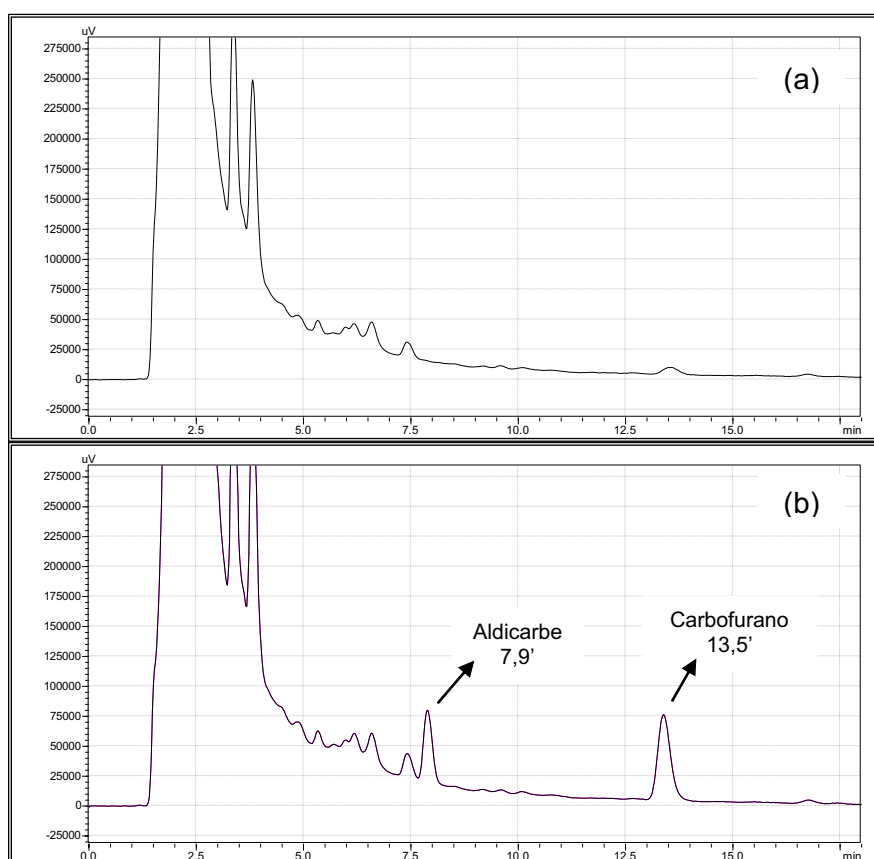


Figura 22. Cromatograma de extrato obtido de café bebida (a) isenta dos princípios ativos; (b) contendo os princípios ativos a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$.

5.6.2. Linearidade de resposta do detector

A linearidade é a resposta obtida em função da concentração do analito, a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado (RIBANI et al., 2004).

O LD é definido como sendo a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente

quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas (PASCHOAL et al., 2008). Já o LQ representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI et al., 2004).

A linearidade de resposta do detector foi verificada pelas curvas analíticas preparadas conforme descrito no item 4.4.2. Desta forma, após análise das soluções padrão preparadas em solvente puro em concentrações entre 0,025 e 250,0 mg L⁻¹ foram construídas curvas analíticas para cada um dos compostos, plotando no eixo y a área do composto de interesse e no eixo X a concentração respectiva ao princípio ativo. Na Figuras 23 estão representadas as curvas analíticas quando soluções padrão foram analisadas por CLAE-UV. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação determinado pela regressão linear.

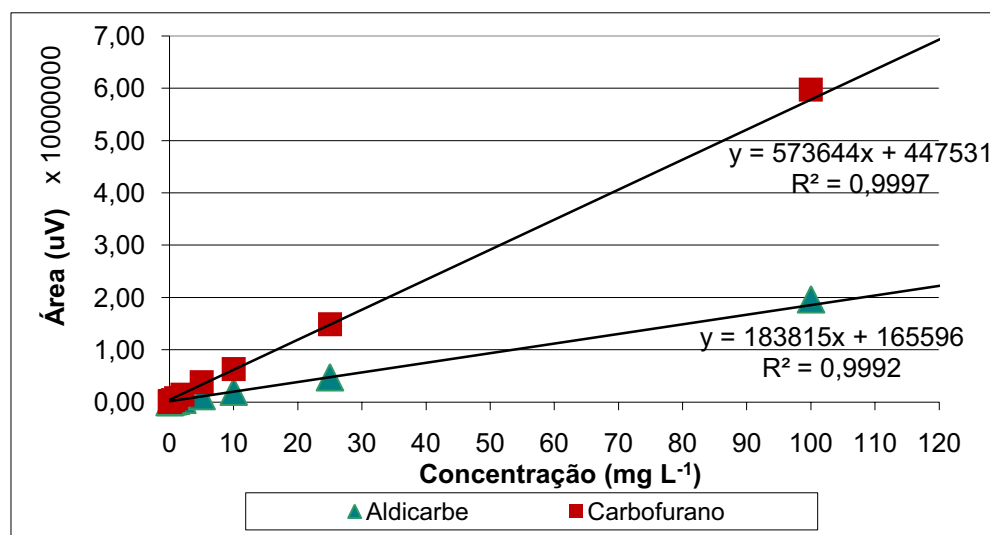


Figura 23. Curva analítica preparada partir de soluções padrão de aldicarbe e carbofurano na faixa de concentração entre 0,025 e 250,0 mg L⁻¹ analisadas por CLAE-UV.

Os coeficientes de determinação (R^2) foram apresentados na Figura 23, extraindo a raiz quadrada dos mesmos, obtendo-se o coeficiente de correlação (r), que para o aldicarbe foi 0,9996 e para o carbofurano, 0,9998. Os quais estão de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA (2003) que recomenda valores superiores a 0,99, indicando que existe uma resposta linear do detector ultravioleta na faixa de concentração estudada para os agrotóxicos aldicarbe e carbofurano.

Além disso, pode-se notar pela inclinação das retas (Figura 23) que o detector ultravioleta (UV) é mais sensível ao carbofurano que ao aldicarbe. Esta sensibilidade está relacionada provavelmente com a presença de maiores sítios de absorção da radiação ultravioleta na estrutura química do carbofurano (estrutura apresentada na Tabela 1, à qual contém anel benzênico e carbonila), enquanto que na estrutura do aldicarbe pode ser verificado além da carbonila apenas elétrons π .

5.6.3. Limite de detecção e quantificação do aparelho

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada um dos agrotóxicos foram determinados pela relação sinal-ruído. A concentração que proporcionou um sinal três vezes maior que o ruído foi estabelecida como sendo o limite de detecção e um sinal dez vezes maior que o ruído, o limite de quantificação.

Para isso foram injetadas concentrações decrescentes (1,0; 0,5; 0,10; 0,05 e 0,025 mg L⁻¹) e próximas ao suposto limite de detecção. Os valores de LD e LQ obtidos para cada um dos carbamatos são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Limites de detecção (LD) e Limites de quantificação (LQ) do aparelho

	Aldicarbe	Carbofurano
LD (mg L ⁻¹)	0,03	0,03
LQ (mg L ⁻¹)	0,10	0,10

Verificou-se que os valores dos limites de detecção e quantificação do aparelho obtidos para análise dos compostos aldicarbe e carbofurano utilizando CLAE-UV foram respectivamente 0,03 e 0,10 mg L⁻¹ para ambos compostos. A legislação brasileira não faz nenhuma referência aos limites máximos de resíduos permitidos em café bebida. Estabelece, no entanto, que em solos de cultura de café, a quantidade máxima permitida é de 0,1 mg kg⁻¹ (ANVISA, 2010) para ambos. Já o *Codex Alimentarius* (2009) estabelece 0,1 mg kg⁻¹ o limite máximo de resíduos em grãos de café.

5.6.4. Linearidade do método e Faixa de trabalho

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentração do analito na qual o método pode ser aplicado. Segundo a ANVISA (2003), a curva analítica representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito.

A linearidade de resposta do método foi verificada pelas curvas analíticas preparadas conforme descrito no item 4.4.4, através do cálculo do coeficiente de correlação (r).

Desta forma, após análise dos extratos preparados em café bebida fortificado em concentrações entre 0,025 e 250,0 mg L⁻¹ e submetidos ao método de ELL-PBT, foram construídas curvas analíticas para cada um dos compostos aldicarbe e carbofurano e avaliadas por métodos estatísticos como regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

As equações das curvas analíticas, bem como os valores de R² obtidos para aldicarbe e carbofurano pelo método da superposição de matriz, são apresentadas na Figura 24.

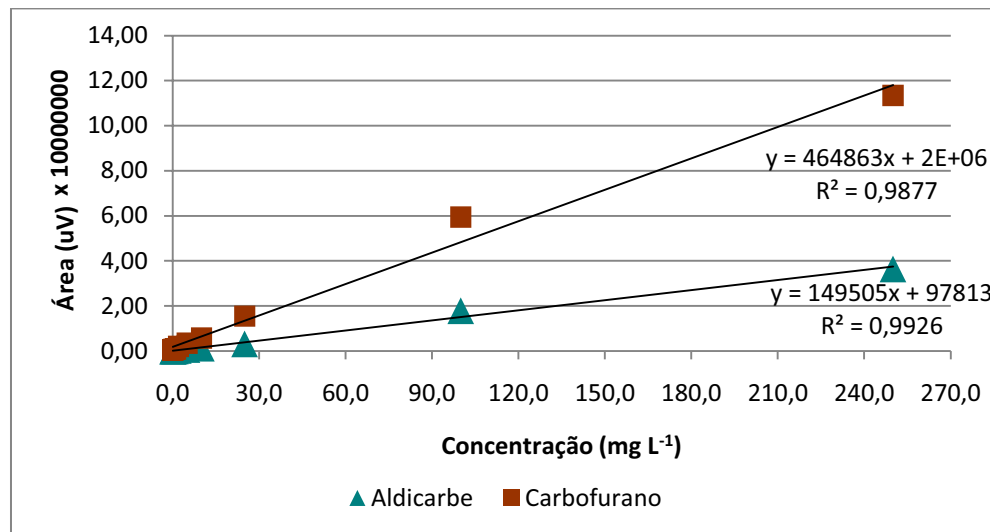


Figura 24. Curva analítica preparada a partir de extratos de café bebida fortificados com padrão de aldicarbe e carbofurano na faixa de concentração entre 0,025 e 250,0 mg L⁻¹ analisados por CLAE-UV.

Determinando o coeficiente de correlação (r) foram obtidos 0,9963 e 0,9938 para aldicarbe e carbofurano, respectivamente. Assim, ambas curvas analíticas obtidas pela superposição de matriz utilizando o método do padrão externo para quantificar, na faixa de concentração estudada, mostraram-se

lineares para aldicarbe e carbofurano, uma vez que o r foi maior que 0,99, conforme recomendação da ANVISA (2003).

A faixa de trabalho utilizada foi de 0,10 a 25,0 mg L⁻¹. A Figura 25 apresenta a curva analítica preparada a partir de extratos de café bebida fortificados com padrão de aldicarbe e carbofurano na faixa de concentração entre 0,10 e 25,00 mg L⁻¹ analisados por CLAE-UV. Os coeficientes de correlação foram superiores a 0,99, mostrando que a mesma é linear (0,9993 para aldicarbe e 0,9980 para o carbofurano).

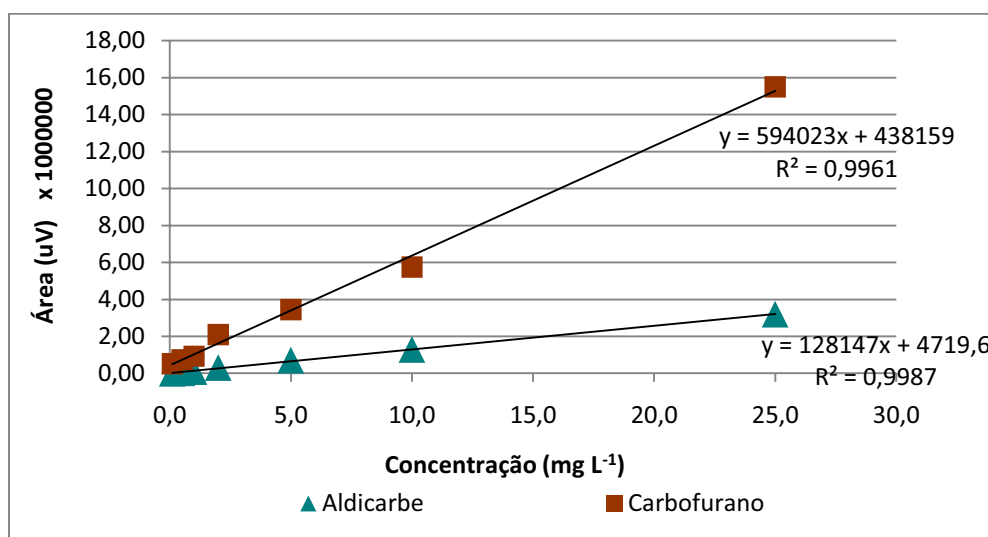


Figura 25. Curva analítica preparada a partir de extratos de café bebida fortificados com padrão de aldicarbe e carbofurano na faixa de concentração entre 0,10 e 25,0 mg L⁻¹ analisados por CLAE-UV.

É importante destacar que os coeficientes de regressão das curvas analíticas preparadas a partir de extratos de café bebida fortificados com padrão de aldicarbe e carbofurano na faixa de concentração entre 0,10 e 25,0 mg L⁻¹ (Figura 25) diferem dos parâmetros obtidos nas curvas analíticas preparadas a partir de extratos de café bebida fortificados com padrão dos analitos em concentração entre 0,025 e 250,0 mg L⁻¹ (Figura 24).

5.6.5. Limite de detecção e quantificação do método

Para o estabelecimento do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método ELL-PBT para aldicarbe e carbofurano em café bebida neste estudo, utilizou-se do método sinal-ruído. Para isso, foram estabelecidos as concentrações mínimas dos analitos na matriz que resultaram em picos com a

razão sinal-ruído 3:1, em que os mesmos puderam ser detectados e identificados com segurança, sem que fossem necessariamente passíveis de ser quantificados. Já o limite de quantificação pelo método sinal-ruído, foi estabelecido por injeções das misturas de soluções padrões no extrato orgânico da matriz com diluições com concentrações conhecidas próximas ao primeiro ponto da curva analítica, até que os sinais emitidos pelos carbamatos resultassem em picos com uma proporção 10:1 da relação sinal-ruído.

As concentrações dos extratos injetados foram: 2,00; 1,00; 0,50; 0,10 e 0,05 mg L⁻¹ e os valores de LD e LQ obtidos para cada um dos agrotóxicos são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Limites de detecção (LD) e Limites de quantificação (LQ) do método

	Aldicarbe	Carbofurano
LD (mg L ⁻¹)	0,54	0,28
LQ (mg L ⁻¹)	1,80	0,92

Assim, observando a Tabela 8, pode-se verificar que os valores dos limites de detecção do método encontrado para aldicarbe e carbofurano foram 0,54 e 0,28 mg L⁻¹, respectivamente. E os limites de quantificação para ambos foram respectivamente 1,80 e 0,92 mg L⁻¹.

5.6.6. Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade dos resultados.

A repetitividade foi estudada pelo cálculo da estimativa do coeficiente de variação (CV) de sete repetições do procedimento otimizado ELL-PBT para os agrotóxicos aldicarbe e carbofurano.

Os resultados do coeficiente de variação obtidos para a amostra de café bebida foram abaixo de 6,2% (Tabela 9). Esses resultados demonstram boa repetitividade, uma vez que os coeficientes de variação se encontram bem abaixo do recomendado para amostras complexas. Segundo RIBANI et al. (2004), são aceitáveis CV de até 20% para amostras complexas, como por exemplo, o café bebida.

Tabela 9. Porcentagens de recuperação (%R), desvio-padrão (s) e coeficiente de variação (CV) após sete extrações dos agrotóxicos em café bebida (10,0 mg L⁻¹).

Agrotóxicos	%R* \pm s	CV
Aldicarbe	75 \pm 4,7	6,2
Carbofurano	102 \pm 5,6	5,4

*Recuperações médias equivalentes a sete repetições.

5.7. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ

Na análise quantitativa de compostos bioanalíticos, drogas e agrotóxicos em matrizes complexas, técnicas sensíveis e seletivas vem sendo utilizadas. Porém, essas técnicas estão susceptíveis ao efeito de matriz, que afeta a precisão, exatidão e a robustez do método (CHAMBERS et al., 2007). Esse efeito é também conhecido como aumento da resposta da matriz cromatográfica, gerando porcentagens de recuperação superiores a 100% e também pode causar outras alterações na análise cromatográfica (PINHO et al., 2009b).

A interferência dos componentes da matriz ocorre porque a curva analítica utilizada para quantificar os pesticidas, geralmente, é preparada em solvente puro. Já na análise dos extratos obtidos por um método de extração adequado, além de apresentar os agrotóxicos, contém uma variedade de compostos co-extraídos da matriz. Estes compostos interferem durante a análise cromatográfica, pois influenciam na quantidade de agrotóxico que é transferido para a coluna (GONZALEZ et al, 2002). Assim, o efeito de matriz gera uma diferença significativa na resposta do analito na amostra quando comparado com o padrão (KLOEPFER et al., 2005).

Alguns trabalhos relatam o efeito de matriz utilizando cromatografia líquida equipados com detectores espectrométricos de massas (EECKHAUT et al., 2009; KRUBE et al., 2009; KRUBE et al., 2008; CHAMBERS et al., 2007; KLOEPFER et al., 2005). Segundo esses autores, o efeito de matriz devido a presença de componentes co-extraídos da matriz que eluem no mesmo t_R que

o analito se deve à competição destes com o analito durante o processo de ionização, resultando ora em decréscimo, ora em aumento da resposta, gerando efeito de matriz negativo ou positivo, respectivamente. O efeito de matriz deve ser investigado em métodos bioanalíticos convencionais como: CLAE-FI, CLAE-UV, CLAE-EM/EM (CASSIANO et al., 2009).

Assim, nesse trabalho, o possível efeito de matriz na análise cromatográfica foi levado em consideração para comprovar a ausência ou presença do fenômeno sobre uma longa faixa de concentração dos analitos na matriz. Para isso, duas séries de soluções padrão foram preparadas, sendo uma em solvente puro e outra em extratos de amostras de café bebida isenta dos agrotóxicos em estudo. As curvas analíticas preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz foram comparadas para os agrotóxicos aldicarbe e carbofurano (Figuras 26a e 26b).

Observando a Figura 26 (a e b), pode-se constatar a presença de efeito de matriz tanto para o aldicarbe quanto para o carbofurano, em virtude das diferenças verificadas nos valores dos coeficientes angulares e lineares das curvas construídas no solvente (acetonitrila) e no extrato orgânico do café bebida. Percebe-se que os padrões preparados em acetonitrila apresentam uma resposta menor do que quando preparados em extratos da matriz. Esse efeito de matriz é mais acentuado para concentrações maiores.

Segundo Pinho (2009) a variação nos coeficientes angulares das duas curvas analíticas indica que os componentes da matriz contribuem para introdução de um erro sistemático proporcional. Já a variação dos coeficientes lineares indica um erro sistemático constante. A variação nos dois coeficientes favorece a ocorrência de ambos os erros, como foi verificado nesse estudo.

Dessa maneira, para identificar o tipo de erro proporcionado pelos componentes da matriz, foi calculada a razão entre os coeficientes das curvas analíticas no extrato da matriz e em solvente puro (Tabela 10).

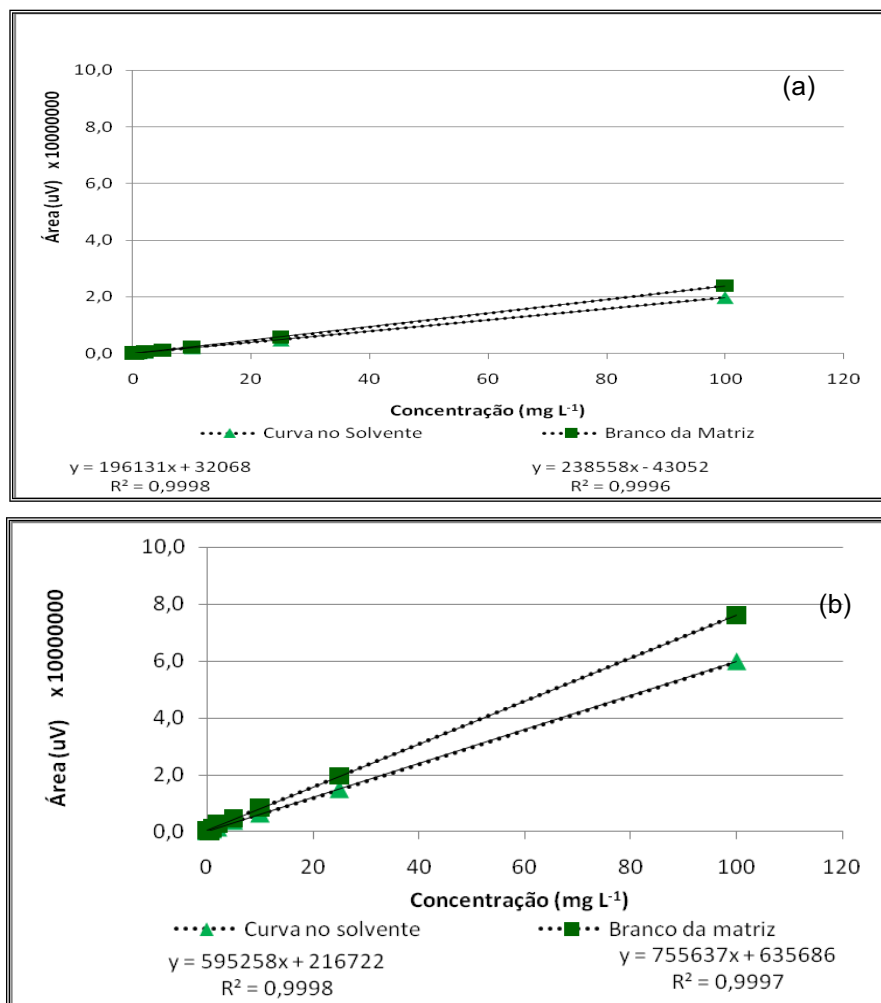


Figura 26. Curvas analíticas preparadas em acetonitrila e branco da matriz: (a) aldicarbe; (b) carbofurano.

Tabela 10. Razão entre os coeficientes angulares e razão entre os coeficientes lineares das curvas analíticas em extrato da matriz e em solvente puro para aldicarbe e carbofurano em café bebida.

	Coeficiente angular		Coeficiente linear		Razão entre coeficientes angulares (matriz/solvente)	Razão entre coeficientes lineares (matriz/solvente)
	Curva no Solvente	Curva Branco da Matriz	Curva no Solvente	Curva Branco da Matriz		
	Aldicarbe	196131	238558	32068		
Carbofurano	595258	755637	216722	635686	1,27	2,93

Considerando somente a relação entre os coeficientes angulares (branco da matriz/solvente), o aumento da resposta cromatográfica foi de 22% para aldicarbe e 27% para o carbofurano. Já a relação entre os coeficientes lineares das curvas, o aumento foi de 34% para aldicarbe e 193% para carbofurano. Dessa forma, para os dois agrotóxicos, o efeito de matriz tem um erro sistemático proporcional e também um erro sistemático constante. E as menores concentrações têm ocasionado um erro sistemático constante significativo principalmente para o carbofurano.

Para a avaliação do grau do efeito de matriz dos extratos de café bebida a 10,0 mg L⁻¹ nas análises por CLAE-UV, comparou entre as áreas obtidas das soluções analíticas em solvente e com as obtidas com soluções analíticas preparadas nos extratos do café bebida. O cálculo foi efetuado através da Equação 4 (CASSIANO et al., 2009) e os resultados do grau do efeito de matriz são apresentados na Tabela 11.

$$\text{Efeito de Matriz (\%)} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

onde:

X₁= Média das áreas da solução analítica de cada agrotóxico preparada em extrato de café bebida numa dada concentração.

X₂= Média das áreas da solução analítica de cada agrotóxico preparada em solvente numa dada concentração.

Tabela 11. Grau do efeito de matriz para aldicarbe e carbofurano em café bebida (10,0 mg L⁻¹).

AGROTÓXICO	Média das áreas obtidas (triplicata)		Efeito de Matriz
	Curva no Solvente	Curva Branco da Matriz	Variação (%)
Aldicarbe	1154246,5	1132097,5	-1,92
Carbofurano	3790199,0	4837783,5	27,6

Observa-se que ambos os compostos sofrem efeito de matriz, sendo esse efeito mais evidente para o carbofurano, uma vez que a variação

percentual das inclinações das curvas analítica em solvente e na matriz foi ligeiramente maior para o mesmo. O efeito de matriz provocou uma supressão na resposta do aldicarbe em 1,92% e um aumento na resposta do carbofurano em 27,6%.

A correção desses erros nas taxas de recuperação pode ser obtida com preparo de uma curva analítica substituindo o solvente puro por extratos da matriz isenta de agrotóxicos (branco da matriz), durante a diluição das soluções padrão nas diversas concentrações (RIBANI et al, 2004). Cassiano et al. (2009) e Chambers et al. (2007) citam além da fortificação do branco da matriz (método de fortificação pós-extração), o método de infusão pós-coluna.

O método de superposição de matriz é usado para compensar o efeito de matriz ou de possíveis interferentes, mas para corrigir esse efeito deve-se utilizar o método de adição de padrão. Entretanto esse método é pouco utilizado, pois diminui muito a frequência analítica (RIBANI et al., 2004).

5.8. APLICAÇÃO DA METODOLOGIA OTIMIZADA

5.8.1. Influência da presença de açúcar e adoçante na determinação dos agrotóxicos

A avaliação da presença de açúcar e adoçante em café bebida na determinação de aldicarbe e carbofurano foi avaliada comparando as respostas desses em relação a resposta das amostras sem adição de açúcar e adoçante, ou seja, amostras de café sem doce. Os resultados desse estudo são apresentados na Figura 27.

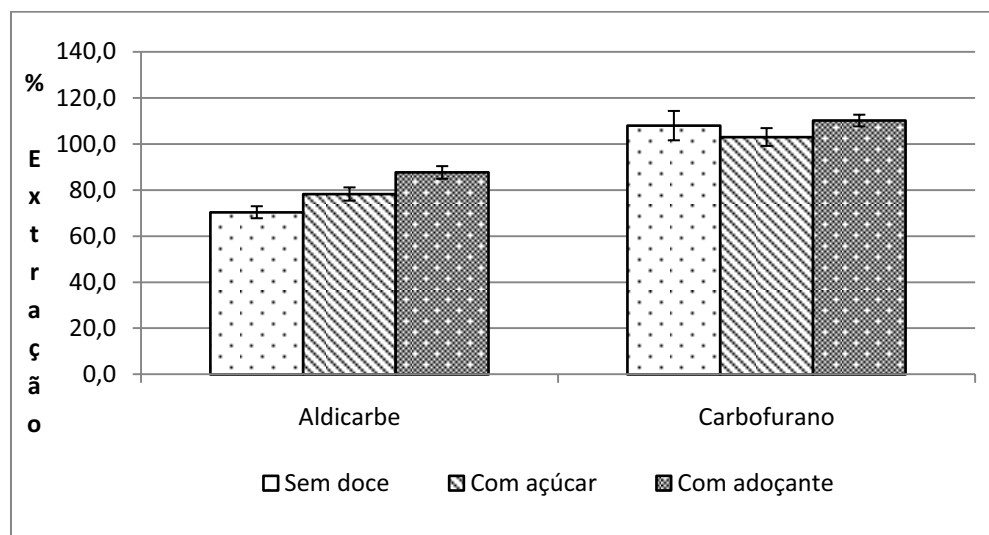


Figura 27. Influência da presença de açúcar e adoçante na determinação de Aldicarbe e Carbofurano em café bebida.

Pelos resultados obtidos, pode-se dizer que ao nível de 95% de confiança pelo teste t de Student, a presença de açúcar e adoçante em café bebida não afetou significativamente a porcentagem de recuperação do carbofurano.

Para o Aldicarbe, foi considerado significativo a influência do adoçante, que aumentou a porcentagem de recuperação desse analito em café bebida.

O adoçante utilizado nesse estudo possui como princípios ativos sacarina sódica (1,2-benzisotiasol-3(2H)-ona, 1,1-dióxido de sódio) e ciclamato de sódio (N-ciclo-hexil-sulfamato de sódio), ambos sais. Possivelmente o efeito *salting-out* auxiliou na liberação dos analitos após solvatação dos sais pela água, aumentando a porcentagem de extração de Aldicarbe. Já o açúcar (sacarose) por ser um composto molecular não favorece a solvatação da água, dessa maneira, não era esperado que a presença desse aumentasse ou diminuísse a eficiência de extração.

5.8.2. Influência da temperatura do café bebida durante a fortificação na eficiência de extração de Aldicarbe e Carbofurano

A água quente aumenta a remoção de agrotóxicos e pode hidrolisar quantidades significativas de compostos não-persistentes (KAUSHIK et al., 2009). Assim, a influência da temperatura da amostra na determinação de

aldicarbe e carbofurano foi avaliada comparando as respostas obtidas. A Figura 28 ilustra os resultados obtidos nesse estudo.

Algumas amostras foram fortificadas com os princípios ativos logo após o preparo do café bebida, cuja temperatura registrada foi 80 °C, essas amostras foram denominadas de café quente. Outras amostras de café bebida foram deixadas à temperatura ambiente até que o equilíbrio térmico ocorresse, sendo verificada no momento da fortificação, nas amostras de café bebida, uma temperatura de 35 °C, essas amostras foram denominadas de café frio.

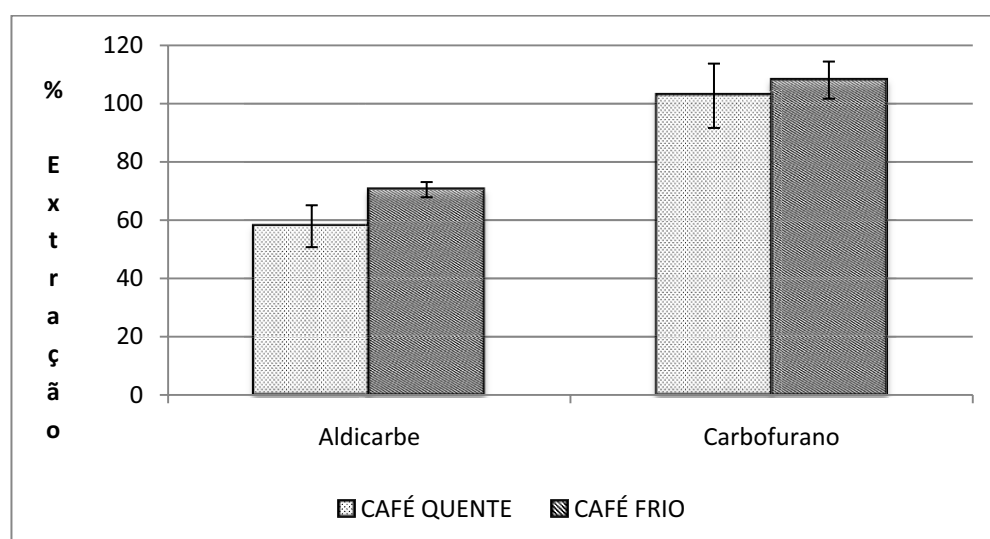


Figura 28. Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano em amostras de café bebida fortificadas em diferentes temperaturas.

Os resultados apresentados na Figura 28 mostraram que não foram verificadas diferenças significativas na porcentagem de extração de aldicarbe e carbofurano ao fortificar as amostras de café em diferentes temperaturas, ao nível de 95% de confiança pelo teste t de Student.

Uma redução significativa nos níveis de aldicarbe e carbofurano era esperada, quando esses agrotóxicos fossem adicionados à amostras de café bebida em temperatura mais elevada, tendo em vista que esses compostos são termicamente lábeis (BASHEER et al., 2009; GARCÍA de LLASERA e BERNAL-GONZÁLEZ, 2001; LACASSIE et al., 2001; ABAD et al., 1999; PLEASANCE et al, 1992).

Conforme apresentado na Tabela 1, o aldicarbe é mais solúvel em água que o carbofurano. Essa diferença de solubilidade ocorre em função de o aldicarbe apresentar um caráter mais polar que o carbofurano. Sendo assim, a

extração do aldicarbe com acetonitrila, é menos eficiente que a do carbofurano, já que este apresenta um caráter menos polar que o outro.

5.8.3. Influência do processamento de café bebida na análise de resíduos de aldicarbe e carbofurano

O processamento de alimentos pode reduzir ou remover resíduos de agrotóxicos presentes nesses alimentos. Estas operações podem ser: lavagem (KAUSHIK et al., 2009; BOULAIID et al., 2005; SOLIMAN, 2001), cozimento (KAUSHIK et al., 2009; BOULAIID et al., 2005; LALAH e WANDIGA, 2002; LENTZA-RIZOS e BALOKAS, 2001; SOLIMAN, 2001), congelamento (KAUSHIK et al., 2009; ABOU-ARAB, 1999), preparo de produtos lácteos (KAUSHIK et al., 2009), fermentação (KAUSHIK et al., 2009), infusão (KAUSHIK et al., 2009; OZBEY e UYGUN, 2007; KUMAR et al., 2005; LINO-MA e SILVEIRA, 1997) e outros (KAUSHIK et al., 2009).

Na fortificação do pó de café com $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de diclorvós, paration metílico e clorpirifós foram encontrados em café bebida 26 e 12% de diclorvós e paration metílico e na fortificação do pó de café com $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ foram encontrados 45 e 18% desses mesmos compostos, respectivamente. Resíduos de clorpirifós não foram detectados em café bebida, em virtude das características apolares desse princípio ativo. Assim, com esse estudo, verificaram que o preparo da bebida provocou redução do diclorvós e clorpirifós adicionados ao pó de café, enquanto paration manteve-se estável. Porém, grande parte dos agrotóxicos permaneceu na borra de café, devendo-se tomar cuidado ao destino desse pó usado (OLIVEIRA et al., 2002).

Para a avaliação da transferência de resíduos de aldicarbe e carbofurano presentes no pó de café para a bebida café, durante a etapa de preparo da mesma como descrito no item 4.3.1, algumas amostras de pó de café foram fortificadas com os princípios ativos numa proporção tal que resultasse em uma bebida contendo os ingredientes ativos na mesma concentração que o café bebida fortificado após o seu preparo. Assim, qualquer diferença de concentração dos princípios ativos verificada, foi em função do preparo da bebida. Os resultados obtidos nesse estudo são apresentados na Figura 29.

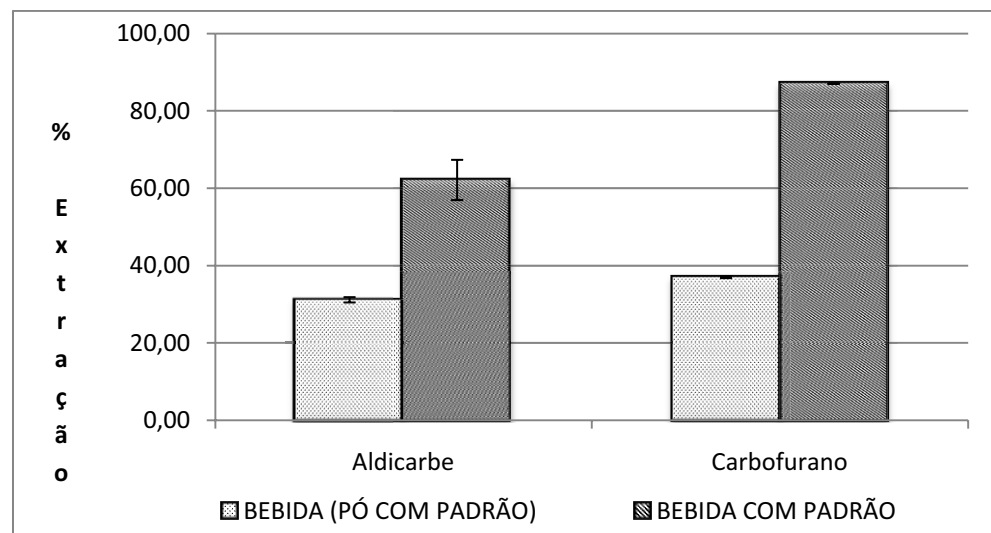


Figura 29. Porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano em amostras de café bebida fortificadas antes do preparo da bebida e após o preparo da bebida.

Comparando as porcentagens de extração de aldicarbe e carbofurano nas amostras de café bebida cujo pó de café foi fortificado com aldicarbe e carbofurano previamente ao preparo da infusão com a bebida café que foi fortificada ($10,0 \text{ mg L}^{-1}$) após o preparo, verificou-se que a etapa de preparo da infusão, favorece perdas significativas dos analitos, (50% e 58% para aldicarbe e carbofurano, respectivamente). Essas perdas podem ter sido ocasionadas pela degradação dos carbamatos ao serem percolados com água a temperatura mais elevada ($90 \text{ }^\circ\text{C}$), pela aderência desses compostos ao papel de filtro ou na borra do café.

Assim, diante do exposto, pode-se ver a necessidade de verificar a presença de resíduos de aldicarbe e carbofurano remanescentes na borra de café. Para tal estudo, aplicou-se a metodologia otimizada para extração desses compostos em café bebida na borra de café, conforme descrito no item 4.7.3.

A análise da borra de café após o preparo da infusão com pó de café fortificado mostrou que mesmo após o preparo do café bebida, ainda remanescem resíduos de aldicarbe e carbofurano, como pode ser observado na Figura 30.

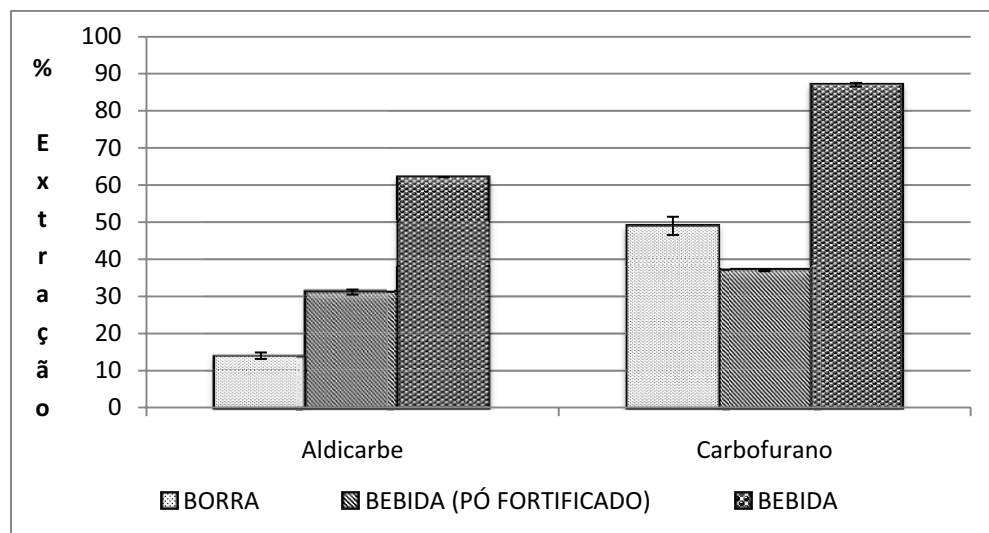


Figura 30. Influência do preparo da bebida na determinação de aldicarbe e carbofurano em café bebida e em borra de café.

Assim, pode-se perceber que o preparo do café bebida é responsável por redução nos níveis de aldicarbe e carbofurano. Vale ressaltar também que uma quantidade considerável desses compostos permanece na borra de café, mostrando que os mesmos se ligam à matéria orgânica e não são arrastados com a água quente.

5.8.4. Avaliação da estabilidade dos produtos comerciais em café bebida

O comportamento de aldicarbe e carbofurano em café bebida por um período de 28 dias foi avaliado após variar alguns fatores como: temperatura de armazenamento das amostras, presença e ausência de luz e açúcar. Os resultados desse estudo são apresentados nas Figuras 31 (a-d) e 32 (a-d).

Observando a Figura 31, pode-se perceber claramente que a degradação de aldicarbe foi mais acentuada que a do carbofurano em todos os tratamentos. À temperatura de 22 °C houve redução de 50% nos níveis de aldicarbe e carbofurano em aproximadamente 5 dias para o primeiro e em 10 e 15 dias para o segundo, sendo essa diferença em virtude da presença ou ausência de açúcar nas amostras.

A degradação de aldicarbe foi mais acentuada que a do carbofurano provavelmente porque o aldicarbe hidrolisa-se mais facilmente que o

carbofurano. O carbofurano, como pode ser observado na Tabela 1, possui um anel aromático em sua estrutura que o protege de tal reação.

A presença de açúcar acentuou a degradação dos compostos. Isso pode estar relacionado possivelmente à degradação microbiana, já que em amostras com açúcar, o aparecimento de leveduras foi verificado logo nos primeiros dias, enquanto que para as outras, o aparecimento das mesmas foi mais tardio.

Microrganismos utilizam carbofurano pela hidrólise da ligação lábil metilcarbamato, formando carbofurano-7-fenol e metilamina. Esse composto pode ser degradado no solo e na água por hidrólise, fotólise e fotodecomposição e muitas bactérias capazes de degradá-lo têm sido isoladas e caracterizadas (BANO e MUSARRAT, 2004)

A influência da luz na degradação de aldicarbe e carbofurano em café bebida à temperatura de 22 °C foi pouco significativa. Mahalakshmi et al. (2007) investigaram o efeito da intensidade de luz na fotodegradação de carbofurano variando a intensidade de 16 até 64 W. Os resultados revelaram que a porcentagem de degradação aumentou com o aumento da intensidade de luz até 64 W. E segundo esses autores, o aumento da intensidade de luz incidente, aumentou a probabilidade de excitação dos elétrons assim como a re-excitação dos elétrons recombinados, favorecendo assim, o aumento da fotólise.

A Figura 32 apresenta os resultados obtidos ao se verificar paralelamente a esse estudo, a influência do açúcar na degradação de aldicarbe e carbofurano para as amostras armazenadas a 4 °C (geladeira) e à -20 °C (em freezer).

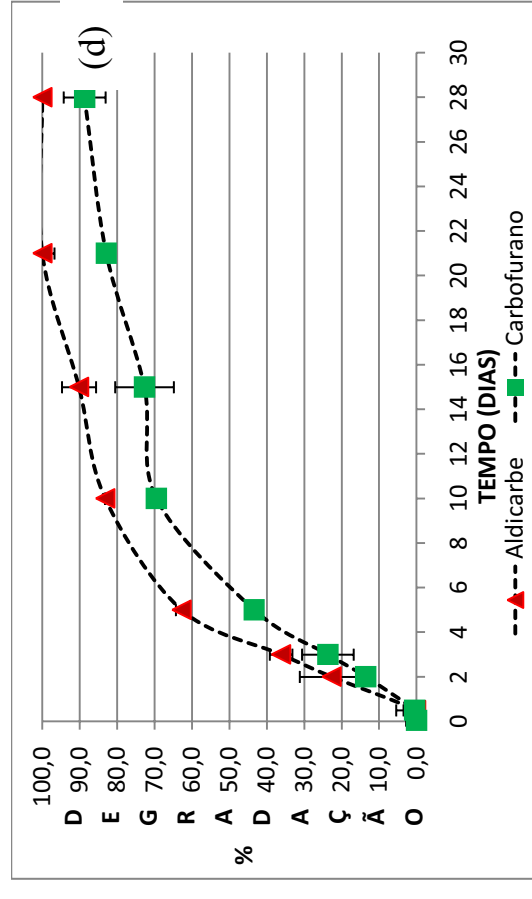
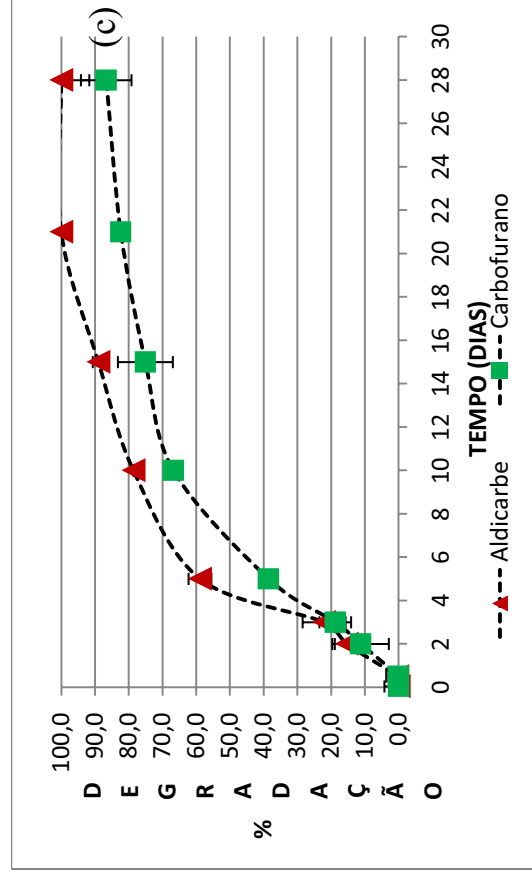
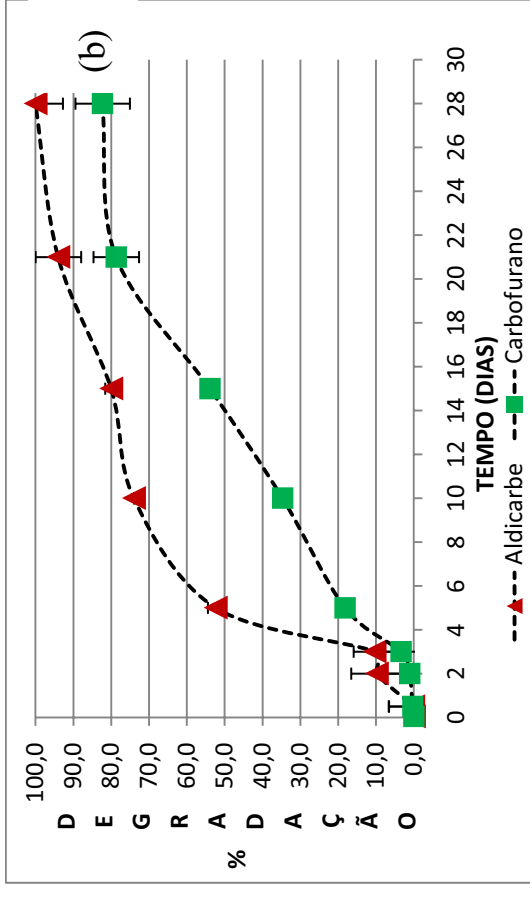
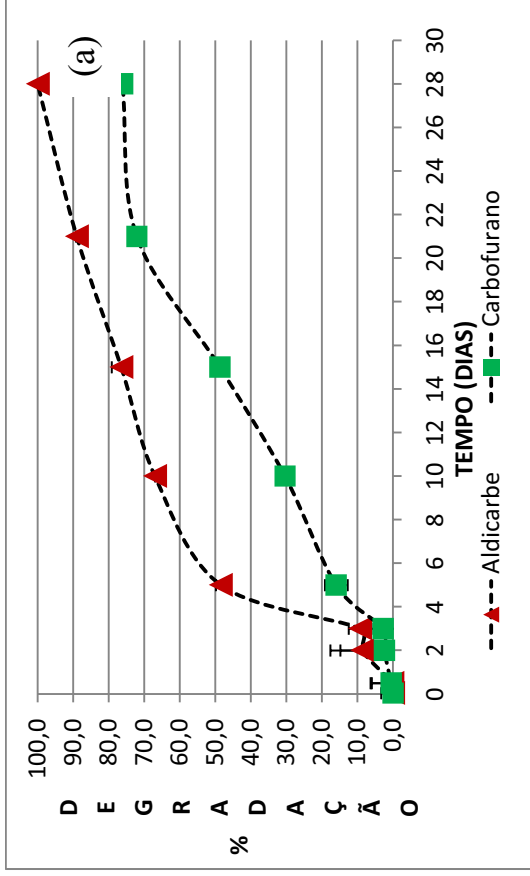


Figura 31. Efeito da luz e do açúcar na degradação dos carbamatos em café bebida a 22 °C: (a) amostras sem açúcar e em ausência de luz; (b) amostras com açúcar e em presença de luz; (c) amostras com açúcar e em presença de luz; (d) amostras sem açúcar e em ausência de luz.

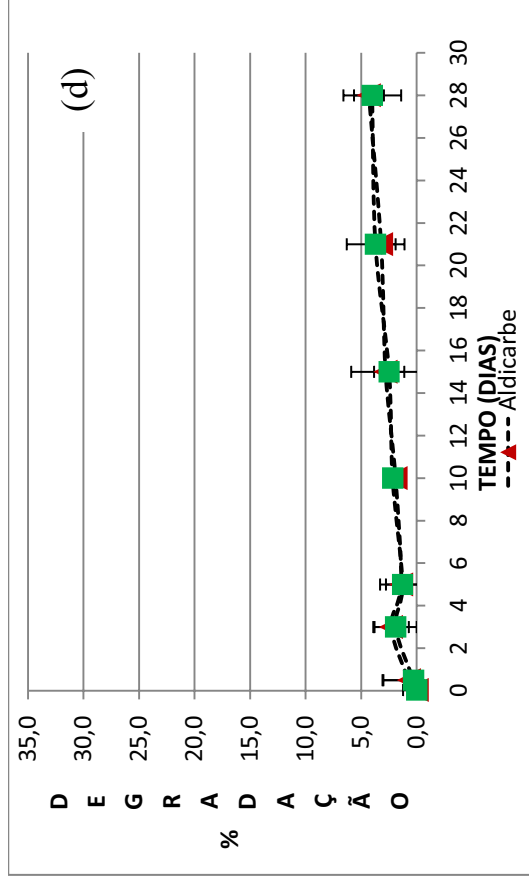
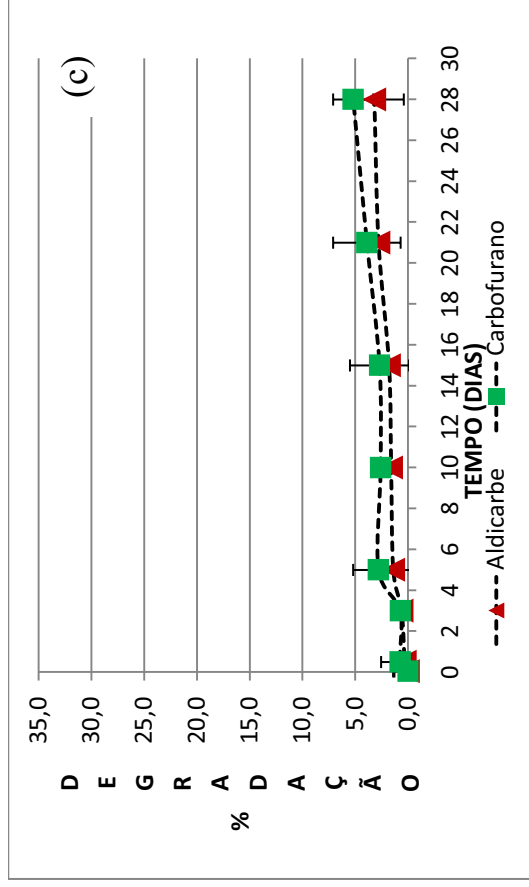
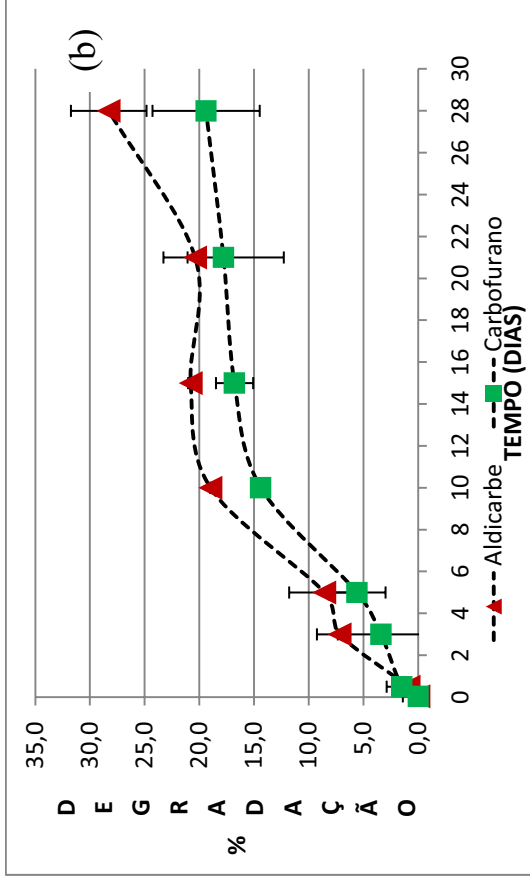
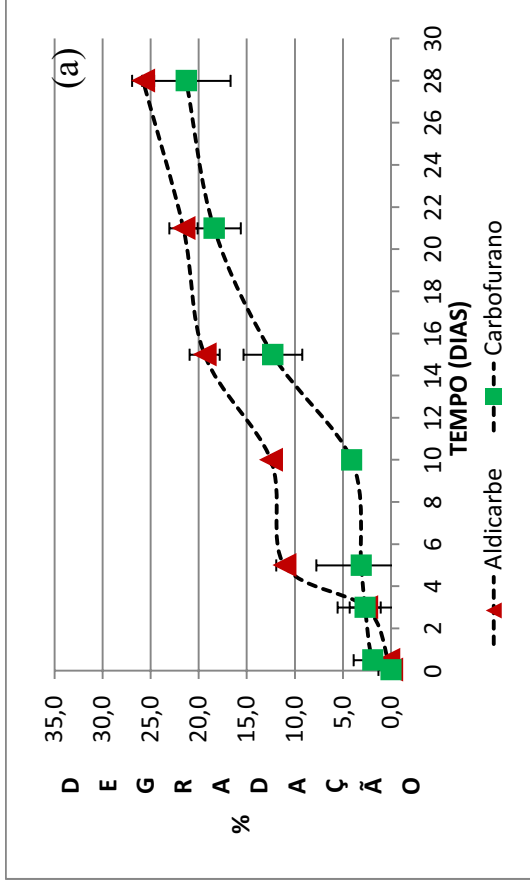


Figura 32. Efeito do açúcar e da temperatura de armazenamento das amostras na degradação dos carbamatos em café bebida: (a) amostras sem açúcar a 4 °C; (b) amostras sem açúcar a -20 °C; (c) amostras com açúcar a 4 °C; (d) amostras com açúcar a -20 °C.

Comparando-se as Figuras 32a e 32b e as Figuras 32c e 32d, percebe-se que a presença de açúcar não afetou significativamente a degradação dos compostos armazenados a temperatura mais baixas, isso pode estar relacionado a velocidade das reações e também à degradação microbiana que é menos intensa em baixas temperaturas.

Relacionando as Figuras 31 e 32, percebe-se que quanto maior a temperatura, mais rápido foi a degradação dos carbamatos, isso já era esperado, pois pela cinética das reações, quanto maior a temperatura, maior a agitação das moléculas, maiores as colisões efetivas, mais rápido a reação. Assim, a degradação foi mais acentuada para as amostras armazenadas à temperatura ambiente (22 °C), seguida pelas armazenadas em geladeira (4 °C) e por último, menos significativo, para as armazenadas em freezer (-20 °C).

A redução verificada para aldicarbe e carbofurano 28 dias após a fortificação foi de 25,8-28,3% e 19,4-21,3% respectivamente, para as amostras armazenadas a 4 °C. Para as amostras armazenadas a -20 °C (congeladas) verificou-se uma redução de 3,2-4,3% e 4,0-5,2%, respectivamente.

Estudos mostrando redução do teor de princípios ativos em alimentos submetidos ao congelamento foram apresentados por Kaushik et al. (2009). Tomates armazenados em freezer por 6 dias tiveram reduções nos níveis de alguns agrotóxicos que variaram de 5,2 a 28,5% e após 12 dias as perdas aumentaram para valores entre 10,6% e 32,6%.

Conclui-se que dos três fatores analisados, a temperatura foi o fator que mais afetou a degradação dos carbamatos, uma vez que favoreceu ao aumento da velocidade das reações e também crescimento microbiano, com consequente degradação microbiana dos compostos. A presença de açúcar foi significativa apenas para os compostos armazenados à temperatura ambiente e a presença de luz foi pouco significativa na redução dos níveis de agrotóxicos em café bebida.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Foi otimizado e validado a técnica ELL-PBT para determinação de aldicarbe e carbofurano em café bebida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) visando a elucidação de casos de interesse forense e agrário.

A técnica otimizada para determinação de carbamatos em café bebida consiste na extração de 2,00 mL da amostra com 4,00 mL de acetonitrila. Essa solução é mantida em agitação mecânica por 5 min. Posteriormente a mistura é levada ao freezer a aproximadamente -20 °C por 3 h. Após esse período, retira-se 1,0 mL da fase orgânica e analisa-se o extrato por CLAE-UV.

A técnica otimizada foi validada determinando as principais figuras de mérito. Os resultados indicam que o método de ELL-PBT é eficiente para a extração dos dois agrotóxicos (aldicarbe e carbofurano) em amostras de café bebida, mostrando porcentagens de recuperação maiores que 94 % e baixos limites de detecção

A presença de açúcar e adoçante em café bebida não afetou significativamente a porcentagem de recuperação do carbofurano. Já o adoçante aumentou a porcentagem de extração do aldicarbe.

A fortificação de café quente não afetou a eficiência de extração. No estudo da estabilidade desses princípios ativos, observou-se que a temperatura foi o fator que mais afetou a degradação dos carbamatos, uma vez que favoreceu ao aumento da velocidade das reações e também crescimento microbiano, com conseqüente degradação microbiana dos compostos. A presença de açúcar foi significativa apenas para os compostos armazenados à temperatura ambiente e a presença de luz foi pouco significativa na redução dos níveis de agrotóxicos em café bebida.

A metodologia otimizada ELL-PBT para extração de resíduos de agrotóxicos em amostras de café bebida e análise por CLAE-UV resultou em um método simples, rápido, prático, com baixo consumo de solvente, número reduzido de etapas, alta frequência analítica, e baixo custo, mostrando-se viável para a determinação dos carbamatos aldicarbe e carbofurano em café bebida. A técnica apresenta grandes perspectivas de ser utilizada em análises agrárias e forenses, onde a eficiência e eficácia são de extrema importância na determinação desses carbamatos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, A.; MORENO, M. J.; PELEGRÍ, R.; MARTÍNEZ, M. I.; SÁEZ, A.; GAMÓN, M.; MONTOYA, A.; Determination of carbaryl, carbofuran and methiocarb in cucumbers and strawberries by monoclonal enzyme immunoassays and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection an analytical comparison. **Journal of Chromatography A**, v. 833, p. 3-12, 1999.

ABIC - Associação Brasileira da Indústria do Café. 2009. Disponível em: <www.abic.com.br>. Acesso em: 03 mar. 2009.

ABOU-ARAB, A. A. K. Behavior of pesticides in tomatoes during commercial and home preparation. **Food Chemistry**, V. 65, N. 4, P. 509-514, 1999.

ADOLESCENTE de 15 anos é suspeita de tentar envenenar família no litoral de SP. 2007. Disponível em: <<http://oglobo.globo.com/sp/matq2009/02/19/adolescente-de-15-anos-suspeita-de-tentar-envenenar-familia-no-litoral-de-sp-754487770.asp>>. Acesso em 11 set. 2009.

AGÊNCIA ESTADO. **MAPA e Cecafé discutem normalização dos embarques de café para o Japão**. 2009. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/agronoticias/noticia.php?id=8588>>. Acesso em 11 set. 2009.

AGUILAR, C.; FERRER, I.; BORRULL, F.; MARCÉ, R. M.; BARCELÓ, D. Monitoring of pesticides in river water based on samples stored in polymeric cartridges followed by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection and confirmation by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 386, p. 237-248, 1999.

ALMEIDA, E. M. de; Controle biológico de cigarras-do-cafeeiro. In.: Reunião Itinerante de fitossanidade do Instituto Biológico, 10, 2004, São Paulo. **Anais...**, São Paulo, 2004.

ALQUINO NETO, F. R. de; e NUNES, D. da S. e S. Extração por fase sólida. In: _____. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, cap. 2, p.5-19, 2003.

ALUNA é acusada de colocar chumbinho na água de bebedouro em escola de JF, 2009. Disponível em: <<http://www.portalclick.com.br/portalclick/2009/11/20/aluna-e-acusada-de-colocar-cchumbinho-na-agua-de-bebedouro-em-escola-de-jf/>>. Acesso em 11 set. 2009.

ALUNAS tentam envenenar diretora. 2006. Disponível em: <http://www.viaseg.com.br/noticias/5006-educacional_alunas_tentam_envenenar_diretora.html>. Acesso em 11 set. 2009.

ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Tocopherols in espresso coffee: analytical method development and validation. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1549-1555, 2009.

ALVES, S. T.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. de T. Metodologia para análise simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em café torrado por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1164-1168, 2006.

ANUÁRIO Brasileiro do Café 2009. Consumo. Disponível em: <<http://www.anuarios.com.br/port/anuario>>. Acesso em: 10 set. 2009.

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. BRASIL. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Resolução**, n. 899, 2003.

_____. 2009a. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/toxicologia>. Acesso em: 14 fev. 2009.

_____. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. **Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008**. 2009b. Disponível

em:< <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/index.htm> >. Acesso em 09 mai. 2009.

_____. Monografias autorizadas. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia?cat=Monografias+de+Agrotoxicos&cat1=com.ibm.>>. Acesso em: 14 jan. 2010.

ARAGÃO, N. M. de; VELOSO, M. C. da C.; ANDRADE, J. B. de. Validação de métodos cromatográficos de análise – Um experimento utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da ‘Química Verde’ na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.

AZEREDO, F. S. de; CUNHA, L. C.; BARROSO, A. V. S.; MORATO, A. F.; COSTA, G. N. F.; NICOLUCCI, A. C.; OLIVEIRA, J. L.; ARRUDA, J. S. Intoxicações por “chumbinho” (aldicarb) provocada por detentos em Agência Prisional (GO) para tentativa de fuga. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 29-31, 2005.

BAIRD, C. Produtos orgânicos tóxicos. In:_____. **Química Ambiental**. 2.ed. São Paulo: Bookman, cap. 6, p. 317-348, 2002.

BANDEIRA, R. D. C. C.; TOCI, A. T.; TRUGO, L. C.; FARAH, A. Composição volátil dos defeitos intrínsecos do café por CG/EM-Headspace. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 309-314, 2009.

BANO, N. e MUSARRAT, J. Characterization of a novel carbofuran degrading *Pseudomonas sp.* with collateral biocontrol and plant growth promoting potential. **FEMS Microbiology Letters**, v. 231, p. 13-17, 2004.

BARCELÓ, D. Environmental Protection Agency and other methods for the determination of priority pesticides and their transformation products in water. **Journal of Chromatography**, n. 643, p.117-143, 1993.

BARON, R. L. A carbamate insecticide: a case study of aldicarb. **Environmental Health Perspectives**, v.102, n.11, p.23-27, 1994.

BARR, D. B.; BARR, J. R.; MAGGIO, V. L.; WHITEHEAD JUNIOR, R. D.; SADOWSKI, M. A.; WHYATT, R. M.; NEEDHAM, L. L.; A muti-analyte method for the quantification

of contemporarar pesticides in human serum and plasma using high-resolution mass-spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 778, p. 99-111, 2002.

BARRIONUEVO, W. R. e LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretroides em água. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 172-175, 2001.

BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como variar tudo ao mesmo tempo. In:_____. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Unicamp, 3. ed, cap 3, p. 115-190, 2007.

BASHEER, C.; ALNEDHARY, A. A.; RAO, B. S. M.; LEE, H. K. Determination of carbamate pesticides using micro-solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 211-216, 2009.

BASHEER, C. e LEE, H. K. Hollow fiber membrane-protected solid-phase microextraction of triazine herbicides in bovine Milk and sewage sludge samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, p. 189-194, 2004.

BASTOS, C. S.; PICANÇO, M. C.; SUINAGA, F. A.; SILVA, E. M.; BADJI, C. A. Impacto do aldicarbe na entomofauna no interior do solo do agroecossistema do cafeeiro. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 3, 2003, Porto Seguro. **Anais...**, Bahia, 2003.

BITTENCOURT, L. M. **Dissipação e monitoramento dos inseticidas clorpirifós e thiametoxam em tubérculos e solo cultivado com batata (Solanum tuberosum)**. Viçosa: 2008. 92p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) -Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2008.

BIZIUK, M. PRZYJAZNY, A.; CZERWINSKI, J.; WIERGOWSKI, M. Occurrence and determination of pesticides in natural and treated waters. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 103-123, 1996.

BOGIALLI, S.; CURINI, R.; CORCIA, A. D.; LAGANÀ, A.; NAZZARI, M.; TONCI, M. Simple and rapid assay for analyzing residues of carbamate insecticides in bovine Milk:

hot water extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 351-357, 2004.

BONATO, P. S. Cromatografia gasosa. In: Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. São Paulo: Unicamp, cap. 8, p. 203-272, 2006.

BORKOVCOVÁ, I.; JANOUŠKOVÁ, E.; ŘEHŮRKOVÁ, I.; RUPRICH J. Determination of N-methylcarbamates in foods. **Central European Journal of Public Health**, v. 12, n. 4, p. 220-223, 2004.

BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

BOULAUD, M.; AGUILERA, A.; CAMACHO, F.; SOUSSI, M.; VALVERDE, A. Effect of household processing and unit-to-unit variability of pyrifenoxy, pyridaben and tralomeprin residues in tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4054-4058, 2005.

BRKIC´, D. V.; VITOROVIC´, S.L.; GASIC´, S. M.; NESKOVIC´, N. K.; Carbofuran in water: subchronic toxicity to rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 25, . 3, p. 334-341, 2008.

CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; SAKIYAMA, N. S.; PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, L. Características rastreáveis das cultivares de café. In: Zambolim, L. (ed.). **Rastreabilidade para a cadeia produtiva do café**. Viçosa: UFV, DFP, cap. 9, p. 248, 2007.

CAMPOS, J. I. **A importância do café nosso de todos os dias**. In.: Embrapa café. Notícias, mai. 2005. Disponível em:<www.embrapa.br>. Acesso em: 12 jul. 2009.

CARBO, L.; SOUZA, V.; DORES, E. F. F. C.; RIBEIRO, M. L. Determination of pesticides multiresidues in shallow groundwater in a cotton-growing region of Mato Grosso, Brazil. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 00, n. 00, p. 1111-1117, 2008.

CARVALHO, G. A.; MIRANDA, J. C.; ECOLE, C. C.; MORAES, J. C.; FERREIRA, A. J.; REIS, K. V. Impacto de inseticidas sobre vespas predadoras e parasitóides, e sua

eficiência no controle do bicho-mineiro do cafeeiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville e Perrotet, 1842) (Lepidoptera:Lyonetiidae). In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 3, 2003, Porto Seguro. **Anais...**, Bahia, 2003.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CHAMBERS, E.; WAGROWSIK-DIEHL, D. M.; LU, Z.; MAZZEO, J. R. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. **Journal of Chromatography B**, n. 852, p. 22-34, 2007.

CHRISMAN, J.R.; SARCINELLI, P. N.; BOCHENER, R.; MARTINS, E. V.; FERREIRA, R. G. S. S.; FERRANTE, A. C. P.; ROSA, A. C. S.; ALMEIDA, M. B. O.; RANGEL, C. F.; MENEZES, M. A. C.; OLIVEIRA-SILVA, J. J. Análise do perfil das mortes violentas causadas por ingestão de Aldicarb no estado do Rio de Janeiro. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA, 14, 2005, Recife. **Trabalho apresentado...** Disponível em:<http://www.fiocruz.br/sinitox/inf_toxicologicas/resumoaldicarb.pdf>. Acesso em 18 fev. 2009.

CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticide Residue in Food**. Maximum Residue Limits. Extraneous Maximum Residue Limits. 2009. Disponível em : <http://www.codexalimentarius.net/mrls/servlet/PesticideServlet?Pesticides=117&Items=280&out_style=by+substance&Domain=PesticideMRLs&Language=english&query_form=%2Fmrls%2Fpestdes%2Fpest_q-e.htm>. Acesso em 16 mai. 09.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira**. Safra 2009, terceira estimativa, 17p., set. 2009. Disponível em:< http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3_levantamento_2009.pdf, >. Acesso em 17 out. 2009.

CORRÊA, M. M.; LIMA, L. A.; MARTINEZ, M. A.; RIGITANO, R. L. O.; SAMPAIO, S. C. Deslocamento miscível de sulfona de Aldicarb em colunas de solo. **Revista brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, PB, v. 3, n. 2, p. 217-221, 1999.

DAMASCENO, L. H. S.; ADORNO, M. A. T.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M; B; A.; ZAIAT, M. Development and validation of a HPLC method for the determination of aldicarb, aldicarb sulfoxide and aldicarb sulfone in liquid samples from anaerobic reactors. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 6, p. 1158-1164, 2008

DARDENGO, R. P. **Análise multiresíduo de inseticidas em batata** (*Solanum tuberosum*). Viçosa: 2007. 106p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2007.

DE MARIA, C. A. e MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

DÍEZ, C.; TRAAG, W. A.; ZOMMER, P.; MARINERO, P.; ATIENZA, J.; Comparison of an acetonitrila extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1131, p. 11-23, 2006.

DIEZ-RODRIGUEZ, G.; BAPTISTA, G. C. de; TREVIZAN, L. R. P.; HADDAD, M. L.; NAVA, D. E. Resíduos de tiametoxam, aldicarbe e de seus metabólitos em folhas de cafeeiro e efeito no controle de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, n.2, p. 257-263, 2006.

EECKHAUT, A. V.; LANCKMANS, K.; SARRE, S.; SMOLDERS, I.; MICHOTTE, Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. **Journal of Chromatography B**, n. 877, p. 2198-2207, 2009.

FARAH, A.; MONTEIRO, M. C.; CALADO, V.; FRANCA, A. S.; TRUGO, L. C. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, v. 98, p. 373-380, 2006.

FERNÁNDEZ, M.; PICÓ, Y.; MANES, J. Determination of carbamate residues in fruits and vegetables by matriz solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 871, p. 43-56, 2000.

FMC CORPORATION. **Carbofuran**: Magnitude of the residue and processing studies with coffee. 8p., 1997.

FUNCIONÁRIOS de hospital bebem café envenenado em Salvador. 2007. Disponível em: <<http://g1.globo.com/Noticias/Brasil/0,,MUL178845-5598,00.html>>. Acesso em 11 set. 2009.

GALLI, A.; SOUZA, D. de; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.

GARCÍA de LLASERA M. P. e BERNAL-GONZÁLEZ, M. Presence of carbamate pesticides in environmental Waters from the northwest of Mexico: determination by liquid chromatography. **Water Research**, v. 35, n. 8, p. 1933-1940, 2001.

GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J. F.; MOLINA-DÍAZ, A. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. **Talanta**, v. 79, n. 2, p. 109-128, 2009

GONÇALVES, W. e FARIA, A. M.; Inseticidas sistêmicos granulados no controle das ninfas móveis das cigarras e seus efeitos na produtividade de cafeeiros. **Bragantia**, Campinas, v. 48, p. 95-108, 1989.

GONÇALVES, W.; SILVAROLLA, M. B.; LIMA, M. M. A. de. Estratégias visando a implementação do manejo integrado dos nematóides parasitos do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, v. 19, n. 193, p. 36-47, 1998.

GONZALEZ, F.J. E.; TORRES, M.E. H.; LOPEZ, E. A., CUADROS-RODRIGUEZ, L.; VIDALA, J. L. M. Matrix-effects of vegetable commodities in electron-capture detection applied to pesticide multiresidue analysis, **Journal of Chromatography A**, v. 966, p. 155-165, 2002.

GOULART, S. M. **Extração de deltametrina e cipermetrina de leite e análise por cromatografia gasosa**. Viçosa: 2004. 60p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, 2004.

GOULART, S. M.; QUEIROZ, M. E. L. R. de; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H. de; Low-temperature clean-up for the determination of pyrethroids in Milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, p. 1320-1323, 2008.

HERCEGOVÁ, A.; DÖMÖTÖROVÁ, M.; MATISOVÁ, E.; Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 54-73, 2007.

HOU L. e LEE, H. K. Determination of pesticides in soil by liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, p. 37-42, 2004.

IAL – Instituto Adolfo Lutz. Café, chá e derivados. In: Sannazzaro, C. A. de C. (Dir.); Zenebon, O.; Pascuet, N. S. (Coord.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo, 4. ed, cap. 12, p. 466- 480, 2004.

ICH – International Conference on Harmonisation. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**. Q2(R1), 2005.

IMOTO, M. N. **Validação de método multiresíduo para pesticidas organohalogenados em maçã por cromatografia gasosa com captura de elétrons (CG/ECD) e cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG/MS)**. Curitiba: 2004. 134p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, 2004.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008, 2003.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. de A.; QUEIROZ, S. C. do N. de. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. São Paulo: Unicamp, cap. 9, p. 273-398, 2006.

JUHLER, R. K.; Optimized method for the determination of organophosphorus pesticides in meat and fatty matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 786, p. 145-153, 1997.

KAUSHIK, G.; SATYA, S.; NAIK, S. N. Food processing a tool to pesticide residue dissipation – a review. **Food Research International**, v. 42, p. 26-40, 2009.

KLOEPFER, A.; QUINTANA, J. B.; REEMTSMA, T. Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, p. 153-160, 2005.

KRUVE, A.; KÜNNAPAS, A.; HERODES, K.; LEITO, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, p. 58-66, 2008.

KRUVE, A.; LEITO, I.; HERODES, K. Combating matrix effects in LC/ESI/MS: the extrapolative dilution approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 651, p. 75-80, 2009.

KUMAR, V.; SOOD, C.; JAGGI, S.; RAVINDRANATH, S. D.; BHARDWAJ, S. P.; SHANKER, A. Dissipation behavior of propargite – an acaricide residues in soil, apple (*Malus pumila*) and tea (*Camellia sinensis*). **Chemosphere**, v. 58, n.6, p. 837-843, 2005.

LACASSIE, E.; MARQUET, P.; GAULIER, J.M.; DREYFUSS, M.F.; LACHÂTRE, G. Sensitive and specific multiresidue methods for the determination of pesticides of various classes in clinical and forensic toxicology. **Forensic Science International**, v. 121, p. 116-125, 2001.

LALAH, J. O. e WANDIGA, O. The effect of boiling on the removal of persistent malathion residues from stored grains. **Journal of Stored Products Research**, v. 38, n.1, p. 1-10. 2002.

LAMBROPOULOU D. A. e ALBANIS, T. A. Application of hollow fiber liquid phase microextractor for the determination of insecticides in water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3359-3365, 2002.

LAMBROPOULOU D. A. e ALBANIS, T. A. Headspace Solid Phase Microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in strawberry and cherry juices. **Journal of Chromatography A**, v. 1072, p. 55-61, 2005.

LEILA Lopes morre em São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://revistaquem.globo.com/Revista/Quem/0,,EMI18276-9531,00-LEILA+LOPES+MORRE+EM+SAO+PAULO.html>>. Acesso em 11 set. 2009.

LENTZA-RIZOS, C.; AVRAMIDES, E. J.; CHERASCO, F.; Low-temperature clean-up method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. **Journal of Chromatography A**, v. 912, p. 135-142, 2001

LENTZA-RIZOS C.; e BALOKAS, A. Residue levels of chlorpropham in individual tubers and composite samples of postharvest-treated potatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 710-714, 2001.

LINO-MA, C. M. e SILVEIRA, I. N. Loss of organochlorine pesticide residues during the processes of infusion linden (*Tilia cordata Mill*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2718-2722, 1997.

MÃE colocou cinco bolinhas de chumbinho no mingau da filha, 2006. Disponível em: <<http://www.elo.com.br/pagina.php?idst=novidade&id=99121>>. Acesso em 11 set. 2009.

MAHALAKSHMI, M.; ARABINDOO, B.; PALANICHAMY, M.; MURUGESAN, V. Photocatalytic degradation of carbofurano using semiconductor oxides. **Journal of Hazardous Materials**, v. 143, n. 1-2, p. 240-245, 2007.

MALDANER, L. e JARDIM, I. C. S. F.; O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MARQUES, M. N.; COTRIM, M. V.; PIRES, M. A. F. Avaliação do impacto da agricultura em áreas de proteção ambiental, pertencentes à bacia hidrográfica do Rio Ribeira de Iguapé, São Paulo. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1171-1178, 2007.

MARTÍN, M. J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A. G. Characterization of arábica and robusta roasted coffee varieties and mixture resolution according to their metal content. **Food Chemistry**, n. 66, p. 365-370, 1999.

MARTINS, E. H. C.; FARIAS, A. J. C.; GONÇALVES, C. S. M.; BÁRBARA, E. B. S.; CUNHA FILHO, E. P. da; BRAGA, A. M. C. B. Intoxicação por aldicarbe na Bahia. **Revista Baiana de Saúde Pública**. V. 29, sup. 1, p. 77-88, jan-jun 2005.

MAŠTOVSKÁ, K. e LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, p. 259-272, 2004.

MELITO, A. E. **Metodologia para identificação cromatográfica de aldicarbe em sangue de cães e gatos intoxicados**. São Paulo: 2004. 63p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004.

MONTEIRO, M. C. e TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 634-637, 2005.

MORAES, A. C. L. **Contribuição para o estudo das intoxicações por carbamatos: o caso do chumbinho no Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: 1999. 111p. Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, 1999.

MORAIS, S. A. L. de; AQUINO, F. J. T. de; NASCIMENTO, P. M. do; NASCIMENTO, E. A. do; CHANG, R. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café conilon submetido a diferentes graus de torra. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 327-331, 2009.

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; DE MARIA, C. A. B. Componentes voláteis do café torrado. Parte II. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, 2000.

NOGUEIRA M. e TRUGO L. C. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 296-299, 2003.

NUNES, G. S.; ALONSO, R. M.; RIBEIRO, M. L.; BARCELÓ, D. Determination of aldicarb, aldicarbe sulfóxido and aldicarbe sulfona in some fruits and vegetables using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 888, p. 113-120, 2000.

NUNES, G. S.; MARQUES, C. V. V. C. O.; CASTILHO, A.; BADEA, M.; MARTY, J.L. Análise de resíduos de inseticidas carbamatos em comidas infantis utilizando biossensores amperométricos à base de enzimas acetilcolinesterases geneticamente modificadas. **Revista Analytica**, n. 20, 2006.

NUNES, G. S.; RIBEIRO, M. L.; POLESE, L.; BARCELÓ, D. Comparison of different clean-up procedures for the determination of N-methylcarbamate insecticides in vegetable matrices by high-performance liquid chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 795, p. 43-51, 1998.

NUNES, G. S.; SANTOS, T. C. R.; BARCELÓ, D.; PIMENTA, A. S.; RIBEIRO, M. L.; Extração por fluido supercrítico de alguns inseticidas carbamatos em amostras de batata, com determinação por HPLC/fluorescência e confirmação por HPLC/espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 25, n.2, p. 214-220, 2002.

OLIVEIRA, J. J. do V.; LOREDO, I. S. D.; RODRIGUES, J.; CASTRO, M. F. P. M. de. Avaliação dos níveis residuais de clorpirifós, diclorvós e paration metílico na borra e na bebida de café. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 15, n.2, p. 75-78, 2002.

OLIVEIRA FILHO, E. C.; NOVAES, L.C. G.; BORGES, D. H. N. Verificação da ocorrência de óbitos com carbamatos no Distrito Federal entre os anos 2000 e 2004 por análise de laudos necroscópicos. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 19, n. 1, p. 19-24, 2008.

OPAS – ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA NA DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília, 69p., 1997.

ORLANDA, J. F. F. **Movimentação do inseticida aldicarbe e seus produtos de degradação em colunas de solos**. 2002. 64 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2002

OZBEY, A. e UYGUN, U. Behaviour of some organphosphorus pesticide residues in peppermint tea during the infusion process. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 237-241, 2007.

PARREIRA, F. V.; PANIAGO, E. B.; CARVALHO, C. R. de; AFONSO, R. J. C. F. Avaliação da presença de pesticidas N-metilcarbamatos e seus produtos de

degradação nas águas da região de Pará de Minas (MG) Brasil. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 11, p. 77-92, 2001.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. da S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n.5, 1190-1198, 2008.

PASSAGLI, M.; BARROCA, M. M.; GUEDES, M. L. O. Técnicas cromatográficas usadas em Toxicologia Forense. In: Tocchetto, D. (Org.); Passagli, M. (aut.). **Toxicologia Forense – Teoria e Prática**. Campinas: Millennium, cap 12, p. 337-360, 2009a.

PASSAGLI, M.; GUEDES, M. L. O.; SOUZA, W. de. Toxicologia dos praguicidas. In: Tocchetto, D. (Org.); Passagli, M. (aut.). **Toxicologia Forense – Teoria e Prática**. Campinas: Millennium, cap 8, p. 223-268, 2009b.

PASSAGLI, M.; MARINHO, P. A.; LORDEIRO, R. A. Validação de métodos químicos. In: Tocchetto, D. (Org.); Passagli, M. (aut.). **Toxicologia Forense – Teoria e Prática**. Campinas: Millennium, cap 13, p. 361-380, 2009c.

PATRÍCIO, F. C.; RIGITANO, R. L. O.; GOUVÊA, A. V.; FRANCO, A. A. Toxicidade do inseticida-nematicida aldicarbe às espécies de peixes *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) e *Orthospinus franciscensis* (Eigenmann, 1929). **Ciência Agrotécnica**, v. 26, n. 2, p. 385-391, 2002.

PEREIRA, S. P.; BLISKA, F. M. de M.; GIOMO, G S.; Desenvolvimento sustentável e os programas de certificação de café em andamento no Brasil. In: Zambolim, L. (ed.). **Rastreabilidade para a cadeia produtiva do café**. Viçosa: UFV, DFP, cap. 4, p. 25-67, 2007.

PESSOA, M. C. P. Y.; CHAIM, A.; GOMES, M. A. F.; SILVA, A. de S.; SOARES, J. M. Simulação de aldicarb e tebuthiuron movimento em solos sob cultivos de banana e cana-de-açúcar no semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 7, n. 2, p. 297-302, 2003.

PICÓ, Y.; FERNÁNDEZ, M.; RUIZ, M. J.; FONT, G. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and

environment. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 117-131, 2007

PINHO, G. P. **Extração de pesticidas em amostras de tomate pelas técnicas: extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) e dispersão de matriz em fase sólida (DMFS) para análise por cromatografia gasosa**. 2007. 85 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2007.

PINHO, G. P. **Efeito de componentes da matriz na análise de agrotóxicos por cromatografia gasosa**. 2009. 120p. Tese (Doutorado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2009.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. de; Análise de resíduos de agrotóxicos em tomates empregando dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n.1, 92-98, 2009a.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. de; SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n.4, 987-995, 2009b.

PLEASANCE, S.; ANACLETO, J. F.; BAILEY, M. R.; NORTH, D. H. An evaluation of atmospheric pressure ionization techniques for the analysis of N-methylcarbamate pesticides by liquid chromatography mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.3, p. 378-397, 1992.

PORTOCARRERO, M. A. Rastreabilidade: passaporte para os mercados. In: Zambolim, L. (ed.). **Rastreabilidade para a cadeia produtiva do café**. Viçosa: UFV, DFP, cap. 2, p. 7-9, 2007.

PORTOCARRERO, M. A.; KOSOSKI, A. R.; Sistema Agropecuário de produção integrada – SAPI: um instrumento para a qualidade e certificação. In: Zambolim, L. (ed.). **Rastreabilidade para a cadeia produtiva do café**. Viçosa: UFV, DFP, cap. 3, p. 11-24, 2007.

PROENÇA, P.; TEIXEIRA, H.; MENDONÇA, M. C. de; CASTANHEIRA, F.; MARQUES, E. P.; CORTE-REAL, F.; VIEIRA, D. N. Aldicarb poisoning: one case report. **Forensic Science International**, v. 146S, p. S79-S81, 2004.

PRZYBYLSKI, C. e BONNET, V. Combination of ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry as tools for investigation of the thermolytic and solvolytic effects: Case of carbamatos analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 23, p. 4787-4797, 2009.

PUSSENTE, I. C. **Extração sólido-líquido e partição em baixa temperatura (ESL-PBT) de clorpirifós, thiametoxam e deltametrina em maçã e análise por cromatografia gasosa**. Viçosa: 2008. 62p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2008.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24 n. 1, 2001.

RAGOUCY-SEGLER, C.; TRACQUI, A.; CHAVONNER, A.; DAIJARDIN, J. B.; SIMONETTI, M.; KINTZ, P.; PILEIRE, B. Aldicarb poisoning. **Human & Experimental Toxicology**, v. 19, p. 657-662, 2000.

REIS, P. R. Controle químico no manejo integrado da broca-do-café. In: Hohmann, C. L. (org.). *Manejo da Broca de Café, WORKSHOP INTERNACIONAL*, Londrina, 2004. **Anais...** Paraná: IAPAR, p.151-175, 2007.

REIS, P. R. e SOUZA, J. C. de. Manejo integrado de pragas do cafeeiro em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, v. 19, n. 193, p. 17-25, 1998.

REGALLA JUNIOR, C.; NOLDIN, J. A.; SANTOS, A. L. dos; SATO, G.; EBERHARDT, D. S.; Toxicidade aguda de herbicidas e inseticidas utilizados na cultura de arroz irrigado sobre juvenis de carpa (*Cyprinus carpio*). **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.12, p. 59-68, 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, J. S., AUGUSTO, F.; SALVA, T. J. G.; THOMAZIELLO, R. A.; FERREIRA, M. M. C. Prediction of sensory properties of Brazilian Arabica roasted coffees by headspace solid phase microextraction-gas chromatography and partial least squares. **Analytica Chimica Acta**, v. 634, p. 172-179, 2009.

RIGITANO, R. L. de O.; ALVES, AL. D.; SOUZA, J. C. de; FRANCO, A. A. Degradação do inseticida-nematicida aldicarb em solos sob vegetação nativa e sob cultura do cafeeiro. **Ciência Agrotécnica**, v. 25, n. 6, p. 1295-1300, 2001.

RIGITANO, R. L. de O. e GOUVEIA, A. V.; Contaminação de mananciais hídricos com resíduos de inseticidas em Maria da Fé, MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 15, Caxambu, 1995. **Resumos...** Lavras: Sociedade Entomológica do Brasil/UFLA, 1995, p. 809.

RISHER, J. R.; MINK, F. L.; STARA, J. F. The toxicologic effects of the carbamate insecticide aldicarb in mammals: a review. **Environmental Health Perspectives**, v. 72, p. 267-281, 1987.

SIA - Sistema de Informação sobre Agrotóxicos. Base de Dados. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/sia.htm>. Acesso em: 10 mai. 2009.

SILVA, C. L. da. **Análise da vulnerabilidade ambiental aos principais pesticidas recomendados para os sistemas de produção de algodão, arroz, café, cana-de-açúcar, citros, milho e soja**. 2004. 116p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola, Campinas, SP, 2004.

SILVA, E. P. **Validação de um método de extração e análise de multirresíduo de agrotóxicos em carne bovina por cromatografia gasosa**. 2008. 109 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2008.

SILVA, F. C.; CARDEAL, Z. L. Determinação de pesticidas organofosforados em água usando microextração em fase sólida e CGAR-EM. **Química Nova**, v. 22 n. 2, 1999.

SINITOX - Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. **II Informe Unificado das informações sobre agrotóxicos existentes no SUS**. Fiocruz,

Ministério da Saúde, 2008. Disponível em:< <http://www.fiocruz.br/sinitox/>>. Acesso em 12 fev. 2009.

SOLIMAN, K. M. Changes in concentration of pesticide residues in potatoes during washing and home preparation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 8, p. 887-891, 2001.

SOUZA, J. C. de; Cafeicultor: conheça as cigarras que atacam o cafeeiro e saiba como controlá-las com eficiência. **Circular Técnica**, EPAMIG, Centro Tecnológico Sul de Minas, n. 172, 2004.

SOUZA, J. C. de; REIS, P. R.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; DAUN, S. C.; SOUZA, M. de A. Cochonilha-da-raiz do cafeeiro: aspectos biológicos, dano e controle. **Circular Técnica**, EPAMIG, 136. Informe Tecnológico, n. 4, 2001.

TAGA, M. S. e OLIVEIRA, M. C. C.; Detecção de aldicarbe em amostras de café por cromatografia líquida de alta eficiência em um caso de envenenamento. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 14, 2006. **Resumos...** São Paulo, v. 68, p. 176, 2006.

TAYLOR, M. J.; HUNTER, K.; HUNTER, K. B.; LINDSAY, D.; BOUHELLEC, S. L. Multi-residue method for rapid screening and confirmation of pesticides in crude extracts of fruits and vegetables using isocratic liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 982, p. 225-236, 2002.

TENTOU matar a família para ter casa, 2006. Disponível em: <<http://txt.jt.com.br/editorias/2006/07/26/ger-1.94.4.20060726.25.1.xml>>. Acesso em 03 dez. 2009.

TEÓFILO, R. F. e FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v.29, n. 2, p. 338-350, 2006.

TOTTI, S.; FERNÁNDEZ, M.; GHINI, S.; PICÓ, Y.; FINI, F.; MANES, J.; GIROTTI, S. Application of matrix solid phase dispersion to the determination of imidacloprid, carbaryl, aldicarbe, and their main metabolites in honeybees by liquid chromatography-mass spectrometry detection. **Talanta**, v. 69, p. 724-729, 2006.

VALENZUELA, A. I.; LORENZINI, R.; REDONDO, M. J.; FONT, G.; Matriz solid-phase dispersion microextraction and determination by high-performance liquid chromatography with UV detection of pesticide residues in citrus fruit. **Journal of Chromatography A**, v. 839, p. 101-107, 1999.

VAZ, C. M. P.; CRESTANA, S.; MACHADO, S. A. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A. Análise de pesticidas por técnicas eletroanalíticas. **Comunicado técnico – EMBRAPA**. São Carlos: 1996, n. 7, p. 1-12.

VIEIRA, E. M. **Avaliação da contaminação do solo e das águas superficiais e subterrâneas por pesticidas em uma micro-bacia do Rio Paraíba do Sul**. 2005a. 80p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, 2005a.

VIEIRA, H. P. **Otimização e validação da extração simultânea de piretróides em água e solo e análise por cromatografia gasosa**. 2005b. 65 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2005b.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. de. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 535-540, 2007.

WHO – World Health Organization. **Aldicarb**. Environmental Health Criteria. World Health Organization, International Programme on Chemical Safety, n. 121, 1991. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc121.htm>> Acesso em: 23 de janeiro de 2008.

_____. **Aldicarb in Drinking-water**. WHO Guidelines for drinking-water quality, 14p., 2003. <<http://www.inchem.org/documents>> Acesso em: 23 de janeiro de 2008.

_____. **Carbofuran**. Data sheet on pesticides, n. 56, 13p., 2008. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest56_e.htm> Acesso em: 23 de novembro de 2009.

_____. **Carbofuran**. In: Pesticides, p. 3-9, s.d. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents>> Acesso em: 05 de janeiro de 2010.

_____. **Rolling revision of the WHO guidelines for drinking-water quality.** Geneva, 104p. 2004.

YAMASHITA, M. G. N. **Análise de rótulos e bulas de agrotóxicos segundo dados exigidos pela legislação federal de agrotóxicos e afins e de acordo com parâmetros de legibilidade tipográfica.** Bauru: 2008. 188 p. Dissertação (Mestrado em Desenho Industrial)- Unesp/FAAC, 2008.

XAVIER, F. G.; RIGHI, D. A.; SPINOSA, H. S. Toxicologia do praguicida aldicarb (“chumbinho”): aspectos gerais, clínicos e terapêuticos em cães e gatos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1206-1211, 2007.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X.; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* e *C. canephora*). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A. (eds.). **Manual de Fitopatologia.** São Paulo: Agronômica Ceres Ltda, 4. Ed, v. 2 cap. 19, p. 165-180, 2005.

ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E. M.; CAIXETA, E. T.; JESUS JUNIOR, W. C. de. Características rastreáveis do manejo integrado das doenças do cafeeiro. In: Zambolim, L. (ed.). **Rastreabilidade para a cadeia produtiva do café.** Viçosa: UFV, DFP, cap. 5, p. 85-128, 2007.

ZAMBONIN, C. G.; BALEST, L.; BENEDETTO, G. E. de; PALMISANO, F. Solid-phase microextractio-gas chromatography mass spectrometry and multivariate analysis for the characterization of roasted coffees. **Talanta**, v. 66, p. 261-265, 2005.

ZHOU, Z. M.; CHEN, J. B.; ZHAO, D. Y.; YANG, M.M. Determination of four carbamate pesticides in corn by cloud point extraction and high-performance liquid chromatography in visible region based on their derivitization reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57,n.19, p. 8722-8-8727, 2009.