

**SIMONE MACHADO GOULART**

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO COM  
PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA NA ANÁLISE DE  
CARBAMATOS EM ALIMENTOS E BEBIDAS**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2010**

SIMONE MACHADO GOULART

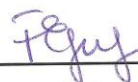
**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO COM  
PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA NA  
ANÁLISE DE CARBAMATOS EM ALIMENTOS E  
BEBIDAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de "Doctor Scientiae."

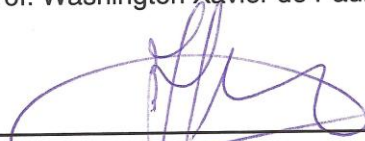
APROVADA: 16 de agosto de 2010



Prof. Washington Xavier de Paula



Prof. Fernando Barboza Egreja Filho



Prof. José Humberto de Queiroz  
(Co-orientador)



Prof. Antônio Augusto Neves  
(Co-orientador)



Prof.<sup>a</sup>. Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz  
(Orientadora)

*À Deus,*

*Aos meus pais Sebastião e Francisca,*

*À João Paulo,*

*À minha irmã Denise,*

*Ao Caio,*

*À minha orientadora,*

*Pelo amor,*

*dedico este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo!

Aos meus pais, pelo carinho, apoio, confiança e compreensão.

Ao João Paulo pela força, carinho, compreensão, paciência, apoio e pela presença em todos os momentos.

A minha irmã Denise e meu cunhado Cássio, por sempre torcerem por mim, pelo carinho, paciência e acolhida.

Ao Caio por sua presença forte em minha vida, iluminando-a.

A professora Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, pelo carinho, confiança, ensinamentos, oportunidades, dedicada orientação, e, principalmente, por ser minha segunda mãe. Enfim, obrigada por tudo!

Aos professores e co-orientadores Antônio Augusto Neves e José Humberto de Queiroz, pela força, ensinamentos, aconselhamentos, pela dedicada orientação e sincera amizade.

A família do meu marido, hoje também minha família, por sempre torcerem por mim, pelo apoio, confiança e carinho.

Aos meus sobrinhos Giulia, Patrick e Cauã pelo carinho e amor que sinto por eles.

À Elenice obrigada por toda ajuda durante as disciplinas, todo apoio, carinho e amizade.

À colega e amiga Renata, obrigada por estar SEMPRE comigo, me ajudando, apoiando e acreditando em mim. Sua amizade sincera foi um presente do doutorado.

Ao Guilherme e Tamires, pelo carinho e pela valiosa contribuição neste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Química Analítica – LAQUA Adriana, Alessandra, Anna Isabel, Carlos, Carol, Elenice, Elisa, Erick, Flaviane, Fernanda, Guilherme, Luiz Manoel, Nayara, Renata, Tamires, Bárbara, Laércio, Mateus, Luciana, Lívia, Juliana, Ana Cláudia, Ana Luiza, Cláudia, Iara e Soraia. Obrigada pela amizade e pela maravilhosa convivência.

Aos amigos de outros laboratórios: Lidiane, Rose, Flaviano, Tiago e Emanuel. A Leandra pela ajuda e apoio nos momentos difíceis de análise e também pelo carinho.

Ao professor Cláudio Ferreira Lima pelo incentivo e apoio.

A amiga Elizete pelo carinho.

Ao Luciano Sindra Virtuoso por incentivar o doutorado, criar possibilidades e por acreditar em mim.

A todos os amigos ex- “LAQUA”; Anízio, Araceli, Telma, Fabrícia, Heulla, Raquel, Patrícia, Gevany, Aline, Jaqueline, Kamilla, Érika, Leila e Igor, pelo auxílio, amizade e pelo inesquecível convívio.

À Elaine Marçal, por ajudar com seu trabalho de conclusão de curso, pela amizade e apoio.

A todos os meus amigos da UNEC, do ANGLO, de Viçosa e de Raul Soares, pelo companheirismo, convívio e amizade.

Ao técnico Ricardo (LAQUA-DEQ-UFV) pela disposição em ajudar sempre e pela amizade.

Ao técnico Zé Luis (LASA - DEQ/UFV) pela colaboração e auxílio em minhas análises.

Ao Professor Antônio Alberto da Silva pelas sugestões e por todo o suporte técnico na realização do trabalho.

Ao Professor e Perito Washington Xavier de Paula, por toda ajuda na realização desse trabalho, por aceitar o convite para compor a banca examinadora e pelas sugestões valiosas.

Ao Professor Fernando Barboza Egreja Filho por aceitar o convite para compor a banca examinadora desta tese e pelas sugestões valiosas.

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.

A todos aqueles que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

## BIOGRAFIA

SIMONE MACHADO GOULART, filha de Sebastião Geraldo Goulart e Francisca Teixeira Machado Goulart, nasceu em Raul Soares, Minas Gerais, em 15 de Março de 1979.

Em abril de 1998, iniciou o Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Laticínios, pela Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se como bacharel em maio de 2002.

Em abril de 2002, iniciou o curso de pós-graduação em Agroquímica (Área de concentração: Química Analítica), em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em 19 de março de 2004.

Em agosto de 2008 iniciou a Complementação Pedagógica em Química, na Universidade Católica de Brasília, diplomando-se como licenciada em Química em julho de 2009.

Em agosto de 2007 iniciou as atividades do doutorado em Agroquímica (Química Analítica) submetendo-se à defesa de tese em agosto de 2010.

# SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE QUADROS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
<b>1. Introdução geral.....</b>	<b>1</b>
1.1 Agrotóxicos – Carbamatos.....	2
1.2 Intoxicações.....	5
1.3 Métodos de Análise.....	7
1.3.1 Extração com partição em baixa temperatura	8
1.4 Validação.....	8
1.5 Objetivos.....	9
1.6 Referências Bibliográficas.....	11
<b>Capítulo 1 - Otimização e validação da técnica extração líquido- líquido com partição em baixa temperatura para determinação de carbamatos em água por CLAE-UV.....</b>	<b>16</b>
1.1 Introdução.....	16
1.2 Materiais e métodos.....	19
1.2.1 Equipamentos.....	19
1.2.2 Condições cromatográficas.....	19
1.2.3 Regentes e soluções.....	20
1.2.4 Preparo de amostras fortificadas.....	20
1.2.5 Otimização da técnica extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura.....	20
1.2.5.1 Planejamento fatorial.....	21
1.2.6 Validação do método.....	23
1.2.7 Aplicação da técnica ELL-PBT .....	24
1.3 Resultados e discussões.....	25

1.3.1	Análise cromatográfica.....	25
1.3.2	Otimização da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura.....	26
1.3.3	Eficiência da partição em baixa temperatura.....	27
1.3.4	Método ELL-PBT otimizado.....	28
1.3.5	Validação do método otimizado.....	29
1.3.5.1	Seletividade .....	29
1.3.5.2	Limite de detecção e limite de quantificação .....	30
1.3.5.3	Sensibilidade e linearidade.....	30
1.3.5.4	Precisão.....	32
1.3.5.5	Exatidão.....	34
1.3.6	Aplicação do método.....	36
1. 4	Conclusões.....	38
1.5	Referências bibliográficas .....	38

**Capítulo 2 – Otimização e validação da técnica extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura para determinação de carbamatos em bebidas de interesse forense.....** 42

2.1	Introdução.....	42
2.2	Materiais e métodos.....	43
2.2.1	Equipamentos.....	43
2.2.2	Condições cromatográficas.....	44
2.2.3	Reagentes e soluções.....	44
2.2.4.	Preparo de amostras fortificadas.....	44
2.2.5	Otimização da ELL-PBT.....	45
2.2.6	Validação do método.....	45
2.2.7.	Aplicação da ELL-PBT.....	46
2.3	Resultados e discussão.....	47
2.3.1.	Análise cromatográfica.....	47
2.3.2	Otimização da ELL-PBT.....	47
2.3.2.1	Proporção entre volume de amostra e solvente extrator.....	50
2.3.2.2.	Adição de sal.....	51
2.3.2.3	Solvente extrator.....	51



2.3.2.4. Processo de homogeneização.....	52
2.3.2.5. Tempo de agitação.....	52
2.3.2.6 Tempo e partição a frio.....	52
2.3.3 Validação do método otimizado.....	53
2.3.3.1. Seletividade.....	53
2.3.3.2 Limite de detecção, limite de quantificação e linearidade.....	55
2.3.3.3. Exatidão e precisão do método.....	56
2.3.3.4. Aplicação do método.....	57
2.4 Conclusão.....	59
2.5 Referências.....	59

**Capítulo 3 - Otimização e validação da técnica extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura para determinação de carbamatos em bolo e brigadeiro.....** 62

3.1. Introdução.....	62
3.2. Materiais e Métodos.....	63
3.2.1 Equipamentos.....	63
3.2.2 Condições cromatográficas.....	64
3.2.3. Reagentes e soluções.....	64
3.2.4. Preparo de amostras fortificadas.....	64
3.2.5. Otimização da ESL-PBT.....	65
3.2.6. Validação do método.....	66
3.2.7. Aplicação da ESL-PBT.....	67
3.3. Resultados e discussão.....	67
3.3.1. Análise cromatográfica.....	67
3.3.2. Otimização da ESL-PBT.....	68
3.3.2.1. Adição de água às amostras sólidas (bolo e brigadeiro).....	71
3.3.2.2. Proporção entre volume de água e solvente extrator.....	72
3.3.2.3. Adição de sal.....	73
3.3.2.4 Solvente extrator.....	73
3.3.2.5. Processo de homogeneização.....	73
3.3.2.6. Tempo de agitação.....	73
3.3.2.7. Tempo de partição a frio.....	74

3.3.3. Validação do método otimizado.....	74
3.3.3.1. Seletividade.....	74
3.3.3.2. Limite de detecção, limite de quantificação e linearidade.....	76
3.3.3.3. Exatidão e precisão do método.....	77
3.3.3.4. Aplicação do método.....	79
3.4 Conclusão.....	80
3.5 Referências.....	81
<b>Capítulo 4- Estabilidade dos carbamatos aldicarb e carbofuran em alimentos e bebidas.....</b>	<b>83</b>
4.1. Introdução.....	83
4.2. Materiais e Métodos.....	86
4.2.1 Equipamentos.....	86
4.2.2 Condições cromatográficas.....	87
4.2.3. Reagentes e soluções.....	87
4.2.4. Preparo de amostras.....	87
4.2.4.1 Estabilidade do aldicarb e carbofuran em água mineral a diferentes valores de pH.....	87
4.2.4.2 Amostras líquidas- Água, achocolatado e suco de uva.....	88
4.2.4.3. Amostras sólidas- Bolo e brigadeiro.....	89
4.2.5.1 Extração dos carbamatos.....	89
4.2.5.2 Extração dos carbamatos em água mineral.....	90
4.2.5.3 Extração dos carbamatos em achocolatado e suco de uva.....	90
4.2.6 Extração dos carbamatos em bolo e brigadeiro.....	90
4.3 Resultados e discussão.....	91
4.3.1. Análise cromatográfica.....	91
4.3.2 Estabilidade dos carbamatos em água a diferentes valores de pH.....	91
4.3.3 Estabilidade dos carbamatos em água.....	95
4.3.4 Estabilidade dos carbamatos em achocolatado.....	99
4.3.5 Estabilidade dos carbamatos em suco de uva.....	102
4.3.6 Estabilidade dos carbamatos em bolo e brigadeiro.....	105
4.4. Conclusão.....	108

4.5. Referências bibliográficas.....	109
<b>Capítulo 5 - Avaliação do efeito de matriz na análise de carbamatos em alimentos e bebidas por CLAE-UV.....</b>	<b>111</b>
5.1. Introdução.....	111
5.2. Materiais e Métodos.....	113
5.2.1 Equipamentos.....	113
5.2.2 Condições cromatográficas.....	113
5.2.3. Reagentes e soluções.....	113
5.2.4. Preparo dos extratos orgânicos das amostras por extração líquido-líquido ou extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT ou ESL-PBT).....	114
5.2.5. Curvas analíticas e seletividade.....	115
5.3. Resultados e discussão.....	116
5.3.1. Análise cromatográfica.....	116
5.3.2. Curvas analíticas e seletividade.....	117
5.3.3 Variação da resposta cromatográfica nas diferentes matrizes.....	125
5.4. Conclusão.....	127
5.5. Referências bibliográficas.....	127
<b>Conclusões gerais.....</b>	<b>129</b>
Sugestões para trabalhos futuros.....	130
Anexo 1.....	131

## LISTA DE QUADROS

		Pág.
Quadro 1	Características dos carbamatos aldicarb, carbofuran e carbaryl	4

## LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1.1.	Planejamento fatorial $2^3$ para amostras de água fortificadas ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ )	22
Tabela 1.2.	Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores ( $\pm$ estimativa do erro experimental) na extração de cada um dos carbamatos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de água, pelo método ELL-PBT	27
Tabela 1.3.	Coefficientes de correlação dos carbamatos nas curvas analíticas construídas em solvente e no branco da matriz.	32
Tabela 1.4.	Porcentagens de recuperação, (%R), e coeficientes de variação, CV (%), obtidos da aplicação do método ELL-PBT, com nove repetições, em amostras de água fortificadas com carbamatos, ( $66 \mu\text{g L}^{-1}$ ), em diferentes dias.	34
Tabela 1.5.	Porcentagens de recuperação, (%R), e coeficientes de variação, CV (%), obtidos da extração de carbamatos em amostras de água fortificadas, em triplicata, pela técnica de ELL-PBT	35
Tabela 1.6.	Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação, CV (%), obtidos de extrações dos carbamatos em amostras de água fortificadas ( $4 \text{ mg L}^{-1}$ ), em	36

triplicata, usando a ELL-PBT e dois métodos.

Tabela 1.7	Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação, CV (%), obtidos de extrações dos carbamatos em três amostras de água de rios fortificadas ( $4 \text{ mg L}^{-1}$ ), em triplicata, usando a ELL-PBT.	38
Tabela 2.1.	Variáveis avaliadas no processo de otimização univariada da ELL-PBT de carbamatos em amostras de suco de uva e bebida láctea achocolatada	45
Tabela 2.2.	Equações lineares do método ELL-PBT para suco de uva	55
Tabela 2.3.	Equações lineares do método ELL-PBT bebida láctea achocolatada	56
Tabela 2.4.	Porcentagens de recuperação dos três agrotóxicos, após extração da amostra de suco de uva fortificada com quatro concentrações diferentes	57
Tabela 2.5.	Porcentagens de recuperação dos três agrotóxicos, após extração da amostra de bebida láctea achocolatada em quatro concentrações diferentes	57
Tabela 3.1.	Variáveis avaliadas no processo de otimização univariada da ESL-PBT de carbamatos em amostras de bolo e brigadeiro	65
Tabela 3.2.	Equações lineares do método ESL-PBT para bolo	77
Tabela 3.3.	Equações lineares do método ESL-PBT para brigadeiro	77
Tabela 3.4.	Porcentagens de recuperação dos três agrotóxicos, após extração da amostra de bolo fortificada com quatro concentrações diferentes	78
Tabela 3.5.	Porcentagens de recuperação dos três agrotóxicos, após extração da amostra de brigadeiro em quatro concentrações diferentes	78
Tabela 4.1.	Equações não lineares dos experimentos de degradação dos carbamatos em água em diferentes valores de pH a 22 e 4 °C.	94

Tabela 4.2.	Equações não lineares dos experimentos de degradação dos carbamatos em água.	96
Tabela 4.3.	Equações não lineares dos experimentos de degradação dos carbamatos em achocolatado.	100
Tabela 4.4.	Equações não lineares dos experimentos de degradação dos carbamatos em suco de uva.	105
Tabela 4.5.	Equações não lineares dos experimentos de degradação dos carbamatos em bolo e brigadeiro.	107
Tabela 5.1.	Descrição do preparo dos extratos de cinco matrizes empregando a ELL-PBT ou ESL-PBT: quantidade de amostra, adição de NaCl, forma e tempo de homogeneização	114
Tabela 5.2.	Razão entre os coeficientes angulares (RCA) e lineares (RCL) das curvas analíticas obtidas em extratos da matriz e em solvente puro (matriz/solvente)	119

## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Fórmula estrutural (a) ácido carbâmico; (b) geral de carbamato	3
Figura 1.1.	Estrutura do Aldicarb, Carbofuran e Carbaryl	17
Figura 1.2.	Cromatogramas de uma solução padrão a 5,0 mg L <sup>-1</sup> de aldicarb (tR = 7,935 min), carbofuran (tR = 13,491 min), e carbaryl (tR = 16,281 min) em acetonitrila, a 195 nm (____) e 213 nm (-----)	25
Figura 1.3.	Porcentagens de recuperação dos carbamatos em função do tempo de resfriamento no freezer	29
Figura 1.4.	(a) - Cromatograma de um extrato obtido de água mineral isenta dos princípios ativos e (b) - cromatograma de um extrato de água mineral contendo os carbamatos a 5,0 mg L <sup>-1</sup> .	30
Figura 2.1.	Cromatograma de uma solução padrão a 5,0 mg L <sup>-1</sup> de aldicarb (tR = 7,935 min), carbofuran (tR = 13,491 min), e carbaryl (tR = 16,281 min) em acetonitrila	48
Figura 2.2.	Porcentagens de extração obtidas na otimização da técnica de ELL-PBT de agrotóxicos em suco de uva: a) relação volume de amostra e solvente b) Adição de sal, c) solvente extrator d) homogeneização e) tempo de agitação f) tempo de partição	49
Figura 2.3.	Porcentagens de extração obtidas na otimização da técnica de ELL-PBT de agrotóxicos em bebida láctea achocolatada: a) proporção entre volume de amostra e solvente b) Adição de sal, c) solvente extrator d) homogeneização e) tempo de agitação f) tempo de partição	50
Figura 2.4.	Cromatograma de um extrato obtido de suco de uva	54

	isento dos princípios ativos (___) e cromatograma de um extrato de suco de uva fortificado com 2500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos carbamatos (----)	
Figura 2.5.	Cromatograma de um extrato obtido de bebida láctea achocolatada isenta dos princípios ativos (___) e cromatograma de um extrato de bebida láctea achocolatada fortificada com 2500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos carbamatos (----)	54
Figura 2.6.	Cromatograma de um extrato obtido de suco de uva adicionado dos produtos comerciais dos carbamatos analisados a 195 nm (___) e 213 nm (----)	58
Figura 2.7.	Cromatograma de um extrato obtido de bebida láctea achocolatada adicionada dos produtos comerciais dos carbamatos analisados a 195 nm (___) e 213 nm (----).	59
Figura 3.1.	Cromatograma de uma solução padrão a 5,0 $\text{mg L}^{-1}$ de aldicarb (tR = 7,935 min), carbofuran (tR = 13,491 min), e carbaryl (tR = 16,281 min) em acetonitrila	68
Figura 3.2.	Porcentagens de extração obtidas na otimização da técnica de ESL-PBT de agrotóxicos em bolo: a) Adição de água b) relação volume de água e solvente c) força iônica, d) solvente extrator e) homogeneização f) tempo de agitação g) tempo de partição	70
Figura 3.3.	Porcentagens de extração obtidas na otimização da técnica de ESL-PBT de agrotóxicos em brigadeiro: a) Adição de água b) proporção entre volume de amostra e solvente c) Adição de sal, d) solvente extrator e) homogeneização f) tempo de agitação g) tempo de partição	71
Figura 3.4.	Cromatograma de um extrato obtido de bolo isento dos princípios ativos (___) e cromatograma de um extrato de bolo fortificado com 2500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos carbamatos (___)	75
Figura 3.5.	Cromatograma de um extrato obtido de brigadeiro isenta dos princípios ativos (___) e cromatograma de um extrato de brigadeiro fortificada com 2500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos	75



	carbamatos (___)	
Figura 3.6.	Cromatograma de um extrato obtido de bolo adicionado dos produtos comerciais dos carbamatos analisados a 195 nm (___) e 213 nm (___)	79
Figura 3.7.	Cromatograma de um extrato obtido de brigadeiro adicionada dos produtos comerciais dos carbamatos analisados a 195 nm (___) e 213 nm (___).	80
Figura 4.1.	Estruturas químicas do aldicarb e carbofuran	84
Figura 4.2.	Produtos de degradação do aldicarb	84
Figura 4.3.	Principais produtos de degradação do carbofuran	85
Figura 4.4.	Cromatograma de uma solução padrão a 5,0 mg L <sup>-1</sup> de aldicarb (t <sub>R</sub> = 7,935 min), carbofuran (t <sub>R</sub> = 13,491 min).	91
Figura 4.5.	Estudos de degradação de aldicarb em água em diferentes valores de pH, a 25 e 4 °C.	92
Figura 4.6.	Estudos de degradação de carbofuran em água em diferentes valores de pH, a 25 e 4 °C.	93
Figura 4.7.	Efeito da luz e da Adição de sal na estabilidade dos carbamatos em amostras de água armazenadas a 22 °C.	96
Figura 4.8.	Efeito da temperatura e da Adição de sal em amostras de água armazenadas a 4 °C e a -20 °C.	98
Figura 4.9.	Efeito da luz e da adição de sal na estabilidade dos carbamatos em amostras de achocolatado armazenadas a 22 °C.	100
Figura 4.10.	Efeito da temperatura e da adição de sal em amostras de achocolatado armazenadas a 4 °C e a -20 °C.	101
Figura 4.11.	Efeito da luz e da adição de sal na estabilidade dos carbamatos em amostras de suco de uva armazenadas a 22 °C.	103
Figura 4.12.	Efeito da temperatura e da adição de sal em amostras de suco de uva armazenadas a 4 °C e a -20 °C	104
Figura 4.13.	Efeito da luz e da temperatura na estabilidade de carbamatos em amostras de bolo armazenadas a 22 °C, 4 °C e -20 °C	106
Figura 4.14.	Efeito da luz e da temperatura na estabilidade de	107

	carbamatos em amostras de brigadeiro armazenadas a 22 °C, 4 °C e -20 °C	
Figura 5.1.	Cromatograma de uma solução padrão a 5,0 mg L <sup>-1</sup> de aldicarb (t <sub>R</sub> = 7,935 min), carbofuran (t <sub>R</sub> = 13,491 min), e carbaryl (t <sub>R</sub> = 16,281 min) em acetonitrila	116
Figura 5.2.	(a) - Cromatograma de um extrato obtido de água mineral isenta dos princípios ativos e (b) - cromatograma de um extrato de água mineral contendo os carbamatos a 5,0 mg L <sup>-1</sup>	117
Figura 5.3.	Cromatogramas de extratos obtidos de suco de uva (a) e bebida láctea achocolatada (b) isentas dos princípios ativos (___) e cromatogramas de extratos de bebidas fortificadas com 2,5 mg L <sup>-1</sup> dos carbamatos (----)	118
Figura 5.4.	Cromatogramas de extratos de bolo (a) e brigadeiro (b) isento dos princípios ativos (___) e cromatograma de extratos fortificados com 2,5 mg L <sup>-1</sup> dos carbamatos (___)	118
Figura 5.5.	Curvas analíticas preparadas em solvente e no branco da matriz (água).	120
Figura 5.6.	Curvas analíticas preparadas em solvente e no branco da matriz (achocolatado)	121
Figura 5.7.	Curvas analíticas preparadas em solvente e no branco da matriz (suco de uva)	122
Figura 5.8.	Curvas analíticas preparadas em solvente e no branco da matriz (bolo)	123
Figura 5.9.	Curvas analíticas preparadas em solvente e no branco da matriz (brigadeiro)	124
Figura 5.10.	Porcentagem de variação da resposta cromatográfica dos carbamatos aldicarb, carbofuran e carbaryl quando preparados em extratos (água mineral, achocolatado, suco de uva, bolo e brigadeiro) em relação às preparadas em solvente puro nas concentrações de 0,05; 0,10; 0,50; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mg L <sup>-1</sup> .	126

## RESUMO

GOULART, Simone Machado, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2010. **Avaliação da técnica de extração com partição em baixa temperatura na análise de carbamatos em alimentos e bebidas.** Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-orientadores: Antônio Augusto Neves e José Humberto de Queiroz.

Os carbamatos são agrotóxicos empregados nas culturas de café, citrus e batata são comumente encontrados em alimentos e bebidas de coloração escura nos casos de intoxicação acidental ou intencional em investigações criminais. Estudos de otimização, validação, estabilidade e efeito de matriz na análise de carbamatos pela técnica de extração com partição em baixa temperatura em água mineral, achocolatado, suco de uva, bolo e brigadeiro foram conduzidos nesse trabalho. Os extratos orgânicos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV). Testes preliminares foram realizados na otimização do método para avaliação de variáveis na extração dos agrotóxicos como: solvente extrator, volume e massa de amostra e de solvente extrator, adição de sal, modo de homogeneização e tempos de agitação, de fortificação e de partição. Para as matrizes água, achocolatado e suco de uva, 2,00 mL de amostra foram colocados em contato com 4,00 mL de acetonitrila. Para água e suco de uva a adição de sal (1,5% de NaCl) aumentou as porcentagens de extração. Após agitação, a amostra foi colocada em freezer por 3 horas para separação das fases e posterior análise da fração orgânica por CLAE-UV. As porcentagens de extração dos carbamatos foram superiores a 90%. Na extração de carbamatos em bolo e brigadeiro a principal diferença da extração, se comparada às demais matrizes, foi a necessidade de se adicionar água (2,00 mL) na matriz antes da extração com solvente orgânico (4,00 mL). O método proposto possibilitou a quantificação de resíduos de aldicarb, carbofuran e carbaryl em amostras de diferentes tipos de bolos e brigadeiro. As porcentagens de recuperação foram superiores a 83%. O método otimizado para cada matriz foi validado, determinando as principais figuras de mérito, como: seletividade,

limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e linearidade. Mesmo empregando pequenos volumes de amostra e solvente, e não necessitando de etapas posteriores de clean-up, a técnica de extração foi seletiva. Para água mineral os limites de detecção e quantificação ficaram entre 5,0 e 10,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 17,0 e 33,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Para achocolatado, suco de uva, bolo e brigadeiro, os limites de detecção e quantificação ficaram entre 8,0 e 15,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 25,0 e 50,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Os fatores avaliados na estabilidade desses carbamatos foram a temperatura de armazenamento, a adição de sal e a luz. Avaliou-se também a estabilidade dos compostos em água mineral em diferentes valores de pH por um período de vinte e oito dias. Os resultados mostraram que a luz, o pH e a temperatura afetam a estabilidade dos carbamatos e que a adição de sal não interfere nessa estabilidade. Em meio alcalino esses compostos são mais instáveis do que em meio ácido. Portanto, amostras de água contaminadas com carbamatos devem ser armazenadas até o momento da análise em freezer, ao abrigo de luz e em pH próximo de 4. Para amostras de achocolatados e suco de uva, a luz, a composição da matriz e a temperatura afetam a estabilidade dos carbamatos. A melhor forma de armazenamento para essas amostras até o momento da análise é em freezer e ao abrigo da luz. Nas matrizes sólidas de bolo e brigadeiro a estabilidade dos compostos não foi afetada significativamente por nenhum dos fatores avaliados. Avaliou-se também o efeito dos componentes da matriz na quantificação desses princípios ativos por CLAE e os resultados indicaram que em todas as amostras de alimentos e bebidas o efeito de matriz apresentado foi relacionado ao erro sistemático constante. Entretanto, para maior confiabilidade dos resultados, nas técnicas extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) e extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) para análise de carbamatos em matrizes de alimentos e bebidas por CLAE-UV, recomenda-se o emprego de curvas analíticas preparadas em extratos da matriz isenta de agrotóxicos (branco da matriz). Finalmente, a extração com partição a baixa temperatura para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos e bebidas por CLAE-UV resultou em um método simples, eficaz, com pequeno consumo de solvente e amostra, alta frequência analítica e baixo custo.

## ABSTRACT

GOULART, Simone Machado, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2010. **Evaluation of extraction technique to partition into low temperature for the analysis of carbamates in foods and beverages.** Adviser: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-advisers: Antônio Augusto Neves and José Humberto de Queiroz.

The carbamate pesticides are used in crops of coffee, citrus and potato, commonly encountered in dark colored foods and beverages in cases of accidental or intentional poisoning in criminal investigations. Optimization studies, validation, stability and matrix effect in the analysis of carbamates by partition extraction technique with low temperature mineral water, chocolate milk, grape juice, cake and Brigadier were conducted in this work. The organic extracts were analyzed by high performance liquid chromatography with ultraviolet detector (HPLC-UV). Preliminary tests were conducted to optimize the method for evaluation of variables in the extraction of pesticides such as organic solvent, volume and mass of sample and organic solvent, ionic strength, method of mixing and stirring times of fortification and partition. For the matrices water, chocolate and grape juice, 2.00 mL sample were placed in contact with 4.00 mL of acetonitrile. For water and grape juice ionic strength (1.5% NaCl) increased the percentages of extraction. After shaking, the sample was placed in the freezer for 3 hours for phase separation and subsequent analysis of the organic fraction by HPLC-UV. The percentages of extraction of carbamate were above 90%. In the extraction of carbamates in the cake and the main difference Brigadier extraction, compared to other matrices, was the need to add water (2.00 mL) in the matrix before extraction with organic solvent (4.00 mL). The proposed method enabled the quantification of residues of aldicarb, carbofuran and carbaryl in samples of different kinds of cakes and Brig. The recovery percentages were above 83%. The optimum method for each array was validated by determining the main figures of merit such as selectivity, limits of detection and quantitation, precision, accuracy and linearity. Even using small volumes of sample and solvent, and not requiring the later

stages of clean-up, the extraction technique was selective. Mineral water for the detection and quantification limits were between 5.0 and 10.0 mg L<sup>-1</sup> and 17.0 and 33.0 mg L<sup>-1</sup>, respectively. For chocolate milk, grape juice, cake and brigadier, limits dectecção and quantification were between 8.0 and 15.0 mg L<sup>-1</sup> and 25.0 and 50.0 mg L<sup>-1</sup>, respectively. The factors evaluated in the stability of these carbamates are the storage temperature, ionic strength and light. In addition, we evaluated the stability of the compounds in mineral water at different pH values for a period of twenty-eight days. The results showed that light, pH and temperature affect the stability of the carbamate and the ionic strength does not affect this stability. In alkaline conditions these compounds are more unstable than in acid medium. Therefore, water samples contaminated with carbamates should be stored until the time of analysis in a freezer, under light and pH around 4. For samples of chocolate and grape juice, light, temperature and matrix composition affect the stability of carbamates. The best way to store the samples until their analysis is in a freezer and protected from light. In the solid matrix of cake and Brigadier stability of the compounds was not significantly affected by any factor evaluated. We also evaluated the effect of matrix components in the quantification of active compounds by HPLC and the results indicated that in all samples alimetros drinks and the matrix effect was made related to the systematic error constant. However, for larger confiabiliade results, techniques ELL-PBT and ESL-PBT for the analysis of carbamates in food matrices and beverages by HPLC-UV, we recommend the use of standard curves prepared in extracts from pesticide-free matrix (white matrix). Finally, the partition extraction with a low temperature for the determination of pesticide residues in samples of foods and beverages by HPLC-UV resulted in a simple, effective, with a small sample and solvent consumption, high sampling rate and low cost.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de agrotóxicos no meio rural brasileiro traz uma série de conseqüências tanto para o ambiente como para a saúde do trabalhador. Em geral, essas conseqüências são condicionadas por fatores intrinsecamente relacionados, tais como: o uso inadequado dessas substâncias, a alta toxicidade de certos princípios ativos, a não utilização de equipamentos de proteção e precariedade dos mecanismos de vigilância. Outro sério problema causado pelos agrotóxicos é a possibilidade de deixar resíduos tóxicos nos alimentos e bebidas. A presença desses compostos em diferentes matrizes gera problemas que devem ser enfrentados com o desenvolvimento de novas metodologias analíticas que permitam avaliar de forma rápida e adequada a qualidade dos alimentos e do ambiente.

No Brasil é possível adquirir facilmente alguns agrotóxicos com alta toxicidade para humanos como também alguns de comercialização restrita. O acesso fácil a essas substâncias, principalmente aquelas usadas no controle de pragas domésticas, tem contribuído para o aumento dos casos de intoxicações agudas em humanos [1]. Essas intoxicações, acidentais ou não, têm gerado grande demanda nos Institutos de Criminalística uma vez que, quando letais podem configurar suicídio ou homicídio [2].

A diversidade de matrizes (achocolatados, doces, vitaminas de frutas, sucos, bombons, etc.) em que esses princípios ativos são encontrados nos casos de intoxicação aguda causada pela ingestão dos mesmos torna o trabalho do Perito Criminal muito complexo. Na literatura, são encontrados poucos relatos relacionados à identificação e quantificação desses princípios ativos em alimentos e bebidas de coloração escura [2, 3, 4], preferencialmente empregados como veículos de envenenamento, visto que as formulações comerciais da maioria dos agrotóxicos apresentam coloração acinzentada.

Grande parte dessas matrizes tem componentes lipídicos que também são extraídos com os princípios ativos. Em análises por cromatografia esses interferentes devem ser eliminados, o que envolve processos de purificação dos extratos.

A busca por métodos mais eficazes para determinar resíduos de agrotóxicos deve ser estimulada tanto sob o ponto de vista ambiental como da toxicologia analítica [5-8]. Em função disso, neste trabalho foram conduzidos estudos de otimização, validação, estabilidade e efeito de matriz na análise de carbamatos pela técnica de extração com partição em baixa temperatura em água mineral, achocolatado, suco de uva, bolo e brigadeiro.

## **1.1 Agrotóxicos – Carbamatos**

Os agrotóxicos são substâncias utilizadas no controle de pragas que atacam culturas. A utilização dessas substâncias tem efeitos sobre a fauna principalmente nas espécies do topo da cadeia alimentar, quando estas se alimentam de insetos e pequenos vertebrados que estiveram em contato com o produto tóxico, o que representa um grande problema de conservação da natureza [9]. É evidente que o uso desses produtos trouxe benefícios à humanidade, entretanto tem sido crescente a preocupação mundial sobre os efeitos prejudiciais desses produtos ao homem [10].

O uso de agrotóxicos deixou de ser uma questão relacionada especificamente à produção agrícola e se transformou em um problema de saúde pública, uma vez que seu consumo dobrou nos últimos 10 anos. O Brasil ocupa o primeiro lugar na lista de países consumidores desses produtos químicos, tendo utilizado, em 2009, mais de 1 bilhão de litros de agrotóxicos [11]. Estes dados mostram a necessidade crescente de pesquisas cada vez mais rigorosas sobre a conveniência do uso dessas substâncias e os riscos para a saúde pública.

Os agrotóxicos dividem-se em quatro grupos principais: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (os únicos relativamente pouco tóxicos para os vertebrados). O grupo dos carbamatos se destaca pela sua alta toxicidade para mamíferos e sua utilização ilegal e indiscriminada como raticida [12].

Os carbamatos são derivados do ácido carbâmico (Figura 1) apresentando instabilidade em condições neutras e alcalinas, à temperatura ambiente. Os compostos deste grupo apresentam alta atividade inseticida; baixa ação residual e baixa toxicidade a longo prazo [13, 14]. Embora



apresentem baixa persistência e tempos de meia vida curto, sofrem oxidação rápida e produzem compostos que são tão tóxicos quanto os mesmos [15].



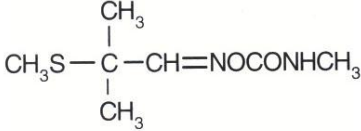
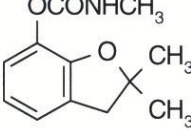
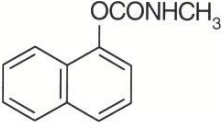
**Figura 1.** Fórmula estrutural (a) ácido carbâmico; (b) geral de carbamato.

Estudos recentes mostram a degradação dos carbamatos em alimentos [16], solo [17, 18] e águas superficiais [19]. 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 [20].

Os principais compostos deste grupo, com seus respectivos nomes comerciais são: carbaryl (Sevin<sup>®</sup>), aldicarb (Temik<sup>®</sup>) e carbofuran (Furadan<sup>®</sup>). As estruturas químicas e principais características [21-23] desses compostos estão apresentadas no Quadro 1.

O aldicarb [2-metil-2(metiltio)-propionaldeido-O-(metil-carbonoil)-oxima] é utilizado para controle sistêmico de uma grande variedade de insetos, ácaros e nematóides, sendo comercializado como Temik<sup>®</sup> ou Temik 150. É registrado para uso em culturas como cana-de-açúcar, frutas cítricas, batata, café, e também em plantas ornamentais [20].

**Quadro 1.** Características dos carbamatos aldicarb, carbofuran e carbaryl

Composto	Aldicarb	Carbofuran	Carbaryl
Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	190,25	221,25	201,22
Estrutura química			
Solubilidade em água (g L <sup>-1</sup> , 20 °C)	6,0	0,7	0,04
Pressão de vapor (mPa)	13,0 (25 °C)	2,66 (33 °C)	0,0416 (25 °C)
Coefficiente de partição octanol-água (log Kow)	1,08	1,13	2,36
DL <sub>50</sub> oral em ratos mg kg <sup>-1</sup>	1	8	850
Principais produtos de degradação	Aldicarb sulfona e aldicarb sulfóxido	3-hidroxicarbofuran e 3-cetocarbofuran	1-naftol

O carbofuran é um inseticida nematocida sistêmico do grupo dos carbamatos conhecido pelo nome químico de 2,3-diidro-2,2-dimetilbenzofurano-7-metilcarbamato [23]. Conforme recomendações da ANVISA [24] o inseticida carbofuran está registrado para controle de diversas pragas em culturas como: café, algodão, arroz irrigado, repolho, amendoim, trigo, cana de açúcar, milho, alface, batata, tomate, tabaco e uva. Os produtos comerciais, contendo como ingrediente ativo carbofuran, mais utilizados na cultura de arroz irrigado são Furadan 50 G e Furadan 100 G (contendo 5% e 10% do ingrediente ativo, respectivamente). Esses produtos são comercializados em formulações granuladas [24].

O carbaryl é um inseticida conhecido quimicamente como 1-naftil-N-metilcarbamato [25]. No Brasil o carbaryl é comercializado com vários nomes entre os quais: Sevin 480 SC, Sevin 850 PM, Carbaryl Fersol Pó 75, Carbaryl

Fersol 480 SC e Carbaryl Fersol 850 PM, estando registrado em algumas formulações para uso em mais de 13 culturas como abacaxi, abóbora, algodão, alho, banana, batata entre outras [26].

## 1.2 Intoxicações

A presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos é um assunto que preocupa consumidores e órgãos de saúde pública devido ao potencial de risco à saúde que pode advir da exposição humana a esses compostos.

A identificação desses compostos em diferentes matrizes como também a sua quantificação é de interesse para controle de qualidade de alimentos tanto como na área criminal uma vez que tem crescido significativamente o número de intoxicações em humanos [5, 27-31] e animais [32, 33].

A toxicidade dos carbamatos para mamíferos é influenciada pelo veículo e pela via de exposição. Uma vez absorvido, os carbamatos são rapidamente distribuídos nos tecidos e órgãos. O metabolismo e a eliminação são relativamente rápidos, e não há evidências de haver bioacumulação de carbamatos [34].

Do ponto de vista toxicológico, o aldicarb é o mais tóxico dentre os carbamatos [35]. Sua dose letal ( $DL_{50}$ ) oral em ratos é de  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$  [21], sendo que a do carbofuran e carbaryl é de  $8,0 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $850 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente [22, 23].

Trotter et al (1991) [36] relatam que algumas espécies de peixes podem ser afetadas quando expostas ao carbofuran em concentrações de até  $80 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $0,08 \text{ mg L}^{-1}$ ) por curtos períodos de tempo. Sintomas subletais já são observados, tais como: hipoatividade, paralisia corporal, curvatura lateral da espinha, perda de equilíbrio e paralisia da boca. Entretanto, os resíduos de carbofuran são depurados do organismo em alguns dias. A hidroxilação do carbofuran em 3-hidroxi-carbofuran, geralmente aumenta a solubilidade [36], sendo mais facilmente excretado [37].

De acordo com Moraes (1999) [38] no Rio de Janeiro, a ocorrência de intoxicações é uma constante, pela utilização ilegal do carbamato aldicarb como raticida. O aldicarb é o carbamato de maior toxicidade disponível no

mercado, não tendo liberação para a sua produção no país. No Brasil, o aldicarb pode apenas ser comercializado para fins agrícolas. Entretanto, a partir de 1989 começaram a aparecer nos grandes hospitais de emergência do Rio de Janeiro e adjacências, casos crescentes de intoxicação aguda por inibidor da colinesterase desconhecido, com inúmeros óbitos. Após investigações, descobriu-se que se tratava principalmente do aldicarb, agrotóxico que estava sendo de alguma forma, desviado do seu uso legal. Tal produto é largamente vendido pelo comércio informal, com o nome de "Chumbinho". Além disso, o aldicarb muitas vezes está associado a outros produtos como o carbofuran e organofosforados no "Chumbinho" [10, 38].

As principais circunstâncias de intoxicação por carbamatos são através do contato acidental, intencional (suicídios e homicídios) e ocupacional [1]. Os últimos dados divulgados recentemente pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox) da Fiocruz são de 2008. Nesse ano, foram registrados 85.925 casos de intoxicação humana. A maioria dos casos de óbito por intoxicação humana foi devido a agrotóxicos de uso agrícola (32,65%) sendo a principal circunstância a tentativa de suicídio (58,76% dos casos). O uso de medicamentos ficou em segundo lugar com 19,73% dos casos de óbito registrados [39].

Nos últimos dois anos, 157 casos envolvendo a contaminação de alimentos e bebidas (carnes, café, leite, sopa, suco, biscoitos e chocolate) contaminados com aldicarb foram relatados no Estado do Rio de Janeiro. A maioria dos eventos criminais foram suicídio e homicídio [4]. A alta incidência de intoxicações graves e mortalidade [40, 41], inclusive em crianças [42, 43], sugerem estratégias preventivas à utilização de carbamatos, a fim de restringir o acesso indiscriminado a esses agentes tóxicos.

Casos de intoxicações por carbamatos são comuns, embora a grande maioria não possua registros. Levigard (2001) [44] recomenda que seja dada especial atenção ao problema da subnotificação de casos de intoxicação em trabalhadores expostos a agrotóxicos, com a efetiva utilização por parte dos profissionais de saúde que atendem a população rural, utilizando instrumentos de notificação, conforme especificado pelo Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos [45].

Na intoxicação por aldicarb, a inibição da acetilcolinesterase é dose-dependente, ou seja, a inibição da acetilcolinesterase vai depender da

quantidade ingerida, podendo haver casos de intoxicações que possam ser reversíveis ou sintomatologia severa com morte rápida [46]. A mais baixa dose letal de aldicarb é desconhecida, porém, estudos em voluntários humanos indicam que uma dose oral de  $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ , induzirá sinais clínicos moderados de toxicidade, entretanto,  $0,26 \text{ mg kg}^{-1}$  produziria envenenamento agudo e necessitaria de tratamento com uma solução injetável de sulfato de atropina [12, 21, 47].

### 1.3 Métodos de análise

O emprego de técnicas de extração e quantificação com alta sensibilidade e que permitam a identificação e quantificação de carbamatos em diferentes matrizes como alimentos e bebidas tem se tornado cada vez mais necessário. Estas necessidades têm surgido em razão de cada vez mais exigências da legislação. Outras exigências de cunho ambiental, forense e de saúde pública têm gerado também a procura e desenvolvimento de técnicas de análise cada vez mais sensíveis, rápidas, de baixo custo e alta frequência analítica. A separação, identificação e quantificação de carbamatos podem ser feitas com exatidão empregando a cromatografia gasosa e cromatografia líquida, mas para tanto é necessário uma etapa prévia de extração e purificação [7].

A técnica utilizada, estabelecida por normas internacionais para análise de agrotóxicos n-metil-carbamatos (NMC) em águas, é a injeção direta da amostra em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de fluorescência [48]. Uma alternativa para estas análises é o emprego do detector ultravioleta (CLAE/UV), que tem sido usado na análise de carbofuran [49, 50, 51], propoxur [52], aldicarb [50, 51] carbaryl [53] e metiocarb [51,53] em água e demais matrizes. Atualmente métodos enzimáticos [4] e a cromatografia de ultra-alta pressão (UPLC) [54] têm sido utilizados na análise de carbamatos em alimentos como carne [4], castanha e pinhão [54] .

Entretanto, para determinar resíduos de agrotóxicos em alimentos e matrizes ambientais, é necessário empregar uma técnica de extração com solvente, seguida por etapas de *clean up* [55]. Assim, novas técnicas de extra-

ção têm sido utilizadas com a mesma finalidade como extração em fluido supercrítico [56], microextração em fase sólida [57, 58], extração em fase sólida [59, 60] dispersão da matriz em fase sólida [61] e a extração com partição em baixa temperatura [62-66].

### **1.3.1 Extração com partição em baixa temperatura**

De modo geral, vários métodos analíticos são propostos para monitoramento ambiental, todavia, a maioria dos procedimentos gera resíduos químicos e conseqüentemente, grande impacto ambiental. Recentemente, as técnicas para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos evoluíram significativamente em termos de simplificação, minimização e melhoria de extração e purificação das amostras. A extração líquido-líquido (ELL) e a sólido-líquido (ESL) com partição em baixa temperatura (PBT) é uma dessas técnicas simples, e apresenta vantagens em relação às demais técnicas de extração. O método é prático, com número de etapas reduzido, alta frequência analítica e principalmente com baixo consumo de amostra e de solventes orgânicos [64].

O princípio da extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura consiste 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  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Em seguida a mistura é agitada e levada ao freezer por um tempo suficiente que permita a separação das fases. Após particionamento, a fase orgânica contendo os analitos (parte superior) é removida e o extrato analisado por cromatografia, fornecendo boas porcentagens de recuperação e limites de detecção de  $0,25\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  [63, 64].

## 1.4 Validação

A necessidade de se mostrar a qualidade das medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento de estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento [67].

Um processo de validação bem definido, documentado, com tratamento estatístico dos dados, oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado. No Brasil, há duas agências credenciadas para verificar a competência de laboratórios de ensaio, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) [68]. No âmbito internacional órgãos como IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), FDA (United States Food and Drug Administration), ISO (International Organization for Standardization) exigem validação de métodos analíticos como requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica [10, 68]

Definições de parâmetros de validação são diferentes entre os diversos órgãos, embora, em sua maior parte, com o mesmo significado e objetivo. Uma tentativa para harmonizar essas diferenças foi realizada para aplicações farmacêuticas por meio da ICH (International Conference on Harmonization), na qual representantes de indústrias e agências de todo o mundo definiram parâmetros e em alguns casos métodos analíticos [68].

Os parâmetros de desempenho analítico para validação de métodos de separação são a seletividade e efeito de matriz, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez [10, 67, 68]. O efeito de matriz é um parâmetro importante porque tem como objetivo avaliar se os componentes da matriz interferem no sinal do analito [10]. Estas interferências podem aumentar a resposta do equipamento para o analito ou diminuí-la [69, 70]. Trabalhos publicados recentemente demonstraram efeito de matriz na determinação de resíduos de agrotóxicos por cromatografia gasosa

[70] e cromatografia líquida de alta eficiência com detector espectrométrico de massas [71, 72].

No tratamento estatístico da linearidade das curvas analíticas, recomenda-se fazer o ajuste exploratório dos dados de cada curva pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) [73, 74]. Os valores dispersos devem ser confirmados e tratados [75, 76]. A normalidade [77], homoscedasticidade [78, 79], independência dos resíduos da regressão e o ajuste ao modelo linear também devem ser verificados [80, 81]. O valor de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) é apenas um indicativo do ajuste dos dados ao modelo matemático escolhido, não devendo ser o único parâmetro escolhido para avaliar a linearidade dos experimentos [10].

## 1.5 Objetivos

Esse trabalho foi dividido em sete etapas, estruturadas em cinco capítulos, uma introdução geral e uma conclusão geral. No capítulo 1 foi realizada a otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para determinação de três carbamatos (aldicarb, carbofuran e carbaryl) em amostras de água por CLAE-UV. Posteriormente a técnica otimizada e validada foi aplicada em amostras “reais”. Esse trabalho foi publicado em 2010, no jornal *Analytica Chimica Acta*, volume 671, páginas 41 a 47.

A extração com partição em baixa temperatura também foi otimizada e validada para análise de carbamatos em amostras de interesse forense, como bebidas (suco de uva e bebida láctea achocolatada) (capítulo 2) e em bolo e brigadeiro (capítulo 3). A quantificação dos agrotóxicos foi feita por CLAE-UV. O capítulo 2 foi submetido ao periódico *Journal of Forensic Sciences*.

No capítulo 4 estudou-se a estabilidade do aldicarb e carbofuran em água mineral, suco de uva, achocolatado, bolo e brigadeiro, por um período de vinte e oito dias. Os fatores avaliados na estabilidade desses carbamatos foram a temperatura de armazenamento, a adição de sal e a luz. Além disso, avaliou-se a estabilidade dos compostos em água mineral a diferentes valores de pH por um período de vinte e oito dias.



Por fim, no capítulo 5 são apresentados os trabalhos de avaliação do efeito de matriz em amostras de água mineral, achocolatado, suco de uva, bolo e brigadeiro na resposta cromatográfica de aldicarb, carbofuran e carbaryl, analisados por CLAE-UV.

## 1.6 Referências Bibliográficas

- [1] FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde. <<http://www.fiocruz.br/sinitox>>
- [2] R. D. Alves. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2010.
- [3] N. M. Aragão, M. C. C. Veloso, J. B. Andrade. Quím. Nova 32 (2009) 2476-2481.
- [4] B. D. Sabino, T. G. Torraca, C. M. Moura, H. F. Rozenbau, M. V. C. Faria, J. Forensic Sci. 55 (2010) 808-812.
- [5] E. Lacassie, P. Marquet, J. M. Gaulier, M. F. Dreyfuss, G. Lachatre, For. Sci. Int. 121 (2001) 116-125.
- [6] F. A. Tarbah, H. Mahler, O. Temme, T. Daldrup, For. Sci. Int. 121 (2001) 126-133.
- [7] C. Basheer, A. A. Alnedhary, B. S. M. Rao, R. Balasubramanian, H. K. Lee, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 211–216.
- [8] K. Granby, J. H. Andersen, H. B. Christensen, Anal. Chim. Acta 520 (2004) 165-176.
- [9] J. C. Moreira, S. C. Jacob, F. P. Peres, A. Meyer, Ciência e Saúde Coletiva. Vol. 7. São Paulo, 2002.
- [10] M. Passagli, Toxicologia Forense- Teoria e prática, 2 ed. Millenium, Campinas, 2009.
- [11] SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola) 2010. Brasil lidera uso mundial de agrotóxicos. <[http://www.sindag.com.br/noticia.php?News\\_ID=1755](http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=1755)>.
- [12] L. H. Machermer, M. Pickel, J. Chromatogr. A 664 (1994) 289-294.
- [13] S. Hatrík, J. Tekel, J. Chromatogr. A 754 (1996) 397-410.
- [14] A. F. Midio, D. I. Martins, Herbicidas em alimentos, Livraria Varela: São Paulo, 1997.

- [15] F. V. Parreira, E. B. Paniago, C. R. Carvalho, R. J. C. F. Afonso, R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente 11 (2001) 77-92.
- [16] G. R. Almeida, F. G. R. Reyes, S. Rath, Quím. Nova, 24 (2001) 768-772.
- [17] R. K. Osborn, S. G. Edwards, A. Wilcox, P. P.J. Haydock, Pest Manag. Sci. 66 (2010) 253–261
- [18] S. Ye, K. Peng, A. T. Lingjun, Lemley, Water Environ. Res. 81 (2009) 29-39.
- [19] Y. Ma, M. Kumar; J. Lin, J. of Environ. Sci. and Health 44 (2009) 914 – 920.
- [20] J. F. Risher, F. L. Mink, J. F. Stara, Env. Health Perspec. 72 (1987) 267-281.
- [21] WHO. Environmental Health Criteria. Aldicarb. Who Technical Report Series, N. 53, (1989).  
<[http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest53\\_e.htm](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest53_e.htm)>
- [22] WHO. Environmental Health Criteria. Carbaryl. Who Technical Report Series, N. 3, (1989). <[http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest3\\_e.htm](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest3_e.htm)>
- [23] WHO. Environmental Health Criteria. Carbofuran. Who Technical Report Series, N. 56, (1989).  
<[http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest56\\_e.htm](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest56_e.htm)>
- [24] ANVISA. Relatório do Agrotóxico.  
<[http://www4.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm\\_dados\\_agrotoxico.asp](http://www4.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_dados_agrotoxico.asp)>
- [25] E. Andrei, Compêndio de defensivos agrícolas. São Paulo: ANDREI, 506p 1996.
- [26] ANVISA. Monografia do carbaril.  
<[http://www4.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm\\_dados\\_ingrediente.asp?iVarAux=1&CodIng=73](http://www4.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_dados_ingrediente.asp?iVarAux=1&CodIng=73)>
- [27] P. Proença, H. Teixeira, M.C. Mendonça, F. Castanheira, E. P. Marques, F. Corte-Real, D. N. Vieira, For. Sci. Int. 146 (2004) 79–81.
- [28] K. Ameno, S. Lee, S. In, J. Yang, Y. Yoo, S. Ameno, T. Kubota, H. Kinoshita, I. Ijiri, For. Sci. Int. 116 (2001) 59-61.
- [29] T. Párron, A. F. Hernández, E. Villanueva, For. Sci. Int. 79 (1996) 53-63.
- [30] H. Teixeira, P. Proença, M. Alvarenga, M. Oliveira, E. P. Marques, D. N. Vieira, For. Sci. Int. 143 (2004) 199–204.
- [31] Q. Liu, L. Zhou, N. Zheng, L. Zhuo, Y. Liu, L. Liu, For. Sci. Int. 193 (2009) 88–94.

- [32] Y. Wang, P. Kruzik, A. Helsberg, I. Helsberg, W. Rausch, *For. Sci. Int.* 169 (2007) 157–160.
- [33] R. Akcan, A. Hilal, N. Daglioglu, N. Cekin, M. K. Gulmen, *For. Sci. Int.* 189 (2009) 82–87.
- [34] R. L. Baron, *Carbamate Insecticides*, 3, 1125-1190, 1991.
- [35] J. Grendon, F. Frost, L. Baum, *Vet. Human Toxicol.* 36 (1994) 218–223
- [36] D. M. Trotter, R.A. Kent, M.P. Wong, *Environ. Control* 21 (1991) 137-176.
- [37] M. P. Mezzari, *Dissertação*, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2000.
- [38] A. C. L. Moraes, *Dissertação*, Escola Nacional de Saúde Pública; Rio de Janeiro, 1999.
- [39] FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde. <[http://www.fiocruz.br/sinitox\\_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=319](http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=319)>
- [40] M. L. F. Oliveira, A. A. Buriola, *Rev Gaúcha Enferm.* 30 (2009) 648-55.
- [41] V. S. M. C. Sálvio, M. A. Babinski, E. A. C. Loaysa, *Acta Scientiae Medica\_ On line* 2 (2009) 22-28.
- [42] O GLOBO, *Jornal*. <<http://oglobo.globo.com/sp/mat/2009/03/19/bolo-envenenado-leva-tres-criancas-para-hospital-em-sao-paulo-754907896.asp>>
- [43] G. L. Werneck, M. H. Hasselmann, *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 55 (2009) 302-307.
- [44] Y. E. Levigard, (*Dissertação*) FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, RIO DE JANEIRO, 2001.
- [45] OPAS/OMS *Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos*. Brasília. (1996).
- [46] C. Ragoucy-Sengler, *Human & Experimental Toxicology*, 19 (2000) 657-662.
- [47] L. Q. A. Caldas, *Pesticide Safety News*, 2 (1998) 2 - 12.
- [48] U.S. Environmental Protection Agency, *National Survey of Pesticides in Drinking Water Wells, Phase II Report*, EPA 570/9-91-020, 1992.
- [49] K. W. Beauchamp, D. D. W. JR. Liu, E.J. J. JR. Kikita, *J. Assoc. Anal. Chem.* 72 (1989) 845-847.
- [50] R. J. Bushway, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49 (1992) 1-9.
- [51] P. Parrila, *Fresenius J. Anal. Chem.* 350 (1994) 633-637.
- [52] Y. J. Kumar, *Environ. Sci. Health*, B18 (1983) 757-765.
- [53] J. T. Moreno, D. M. J. S. Delgado, *Anales de Química*, 91(1995) 365-373.

- [54] L. Qin-Bao, X. Yuan-Yuan, S. Huan. *J. Chromat. Scienc.* 48 (2010) 7-11.
- [55] Z. Sharif, Y. B. C. Man, N. S. A. Hamid, C. C. Keat, *J. Chromatogr. A* 1127 (2006) 254-261.
- [56] G. S. Nunes, T. C. R. Santos, D. Barceló, A. S. Pimenta, M. L. Ribeiro, *Quím. Nova* 25 (2002) 214-220.
- [57] A. Sanusi, V. Guilet, M. Montury, *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 35-40.
- [58] L. J. Krutz, S. A. Senseman, A. S. J. Sciumbato, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 103-121.
- [59] B. Alberio, C. S. Brunete, J. L. Tadeo, *Talanta* 66 (2005) 917-924.
- [60] Lanças, F. M.; *Extração em Fase Sólida*, Editora Rima, São Carlos, 2004.
- [61] G. P. Pinho, A. A. Neves, M. E. L. R. Queiroz, *Quím. Nova* 32 (2009) 92-98.
- [62] H. P. Vieira, A. A. Neves, M. E. L. R. Queiroz, *Quím. Nova* 30 (2007) 535-540.
- [63] S. M. Goulart, M. E. L. R. Queiroz, A. A. Neves, J. H. Queiroz, *Talanta* 75/5 (2008) 1320-1323.
- [64] S. M. Goulart, R. D. Alves, A. A. Neves, J. H. Queiroz, T. C. Assis, M. E. L. R. Queiroz, *Anal Chim Acta* 671 (2010) 41-47.
- [65] G. P. Pinho, A. A. Neves, M. E. L. R. Queiroz, F. O. Silvério, *Food Chem.* 121 (2010) 251-256.
- [66] G. P. Pinho, A. A. Neves, M. E. L. R. Queiroz, F. O. Silvério, *Food Control* 21 (2010) 1307-1311
- [67] M. Ribani, C. B. G. Bottoli, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, L. F. C. Melo, *Quím. Nova* 27 (2004) 771-780.
- [68] R. L. M. Moreau, M. E. P. B. Siqueira, *Toxicologia Analítica*, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 318p, 2008.
- [69] A. Krueve, I. Leito, K. Herodes, *Anal Chim Acta* 651 (2009) 75-80.
- [70] G. P. Pinho, A. A. Neves, M. E. L. R. Queiroz, F. O. Silvério. *Quim Nova* 32 (2009) 987-995.
- [71] N. Mazzella, F. Delmas, B. Delest, B. Méchin, C. Madigou, *J. of Environ. Monitoring* 11 (2009) 108-115.
- [72] A. Krueve, A. Kunnapas, K. Herodes, I. Leito, *J. Chromatogr. A* 2008 11 (2008) 58-66.
- [73] P. C. Meyer, R. E. Zund, *Statistical methods in analytical chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 1993.
- [74] S. V. C. Souza, R. G. Junqueira, *Anal. Chim. Acta* 552 (2005) 25-35.

- [75] D. A. Belsley, E. Kuh,; R. E. Welsch, Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity. New York: Wiley, 1980.
- [76] W. Horwitz, Pure Appl. Chem. 67 (1995) 331-343.
- [77] T. A. Ryan, B. L. Joiner, Normal probability plots and tests for normality. The State College: Pennsylvania State University, 1976.
- [78] H. Levene, Robust tests for equality of variances. In: Olkin, I.; Ghurye, S.G.; Hoeffding, W.; Madow, W.G.; Mann, H.B. (Ed.) Contributions to probability and statistics. Stanford: Stanford University Press, 1960.
- [79] M. B. Brown, A. B. Forsythe, Robust tests for the equality of variances. J. Am. Stat. Assoc. 69 (1974) 364-367.
- [80] J. Durbin, G. S. Watson, Testing for serial correlation in least squares regression ii. Biometrika 38 (1951) 159-178.
- [81] N. Draper, H. Smith, Applied regression analysis. New York: Wiley. 1998.

## **CAPÍTULO 1**

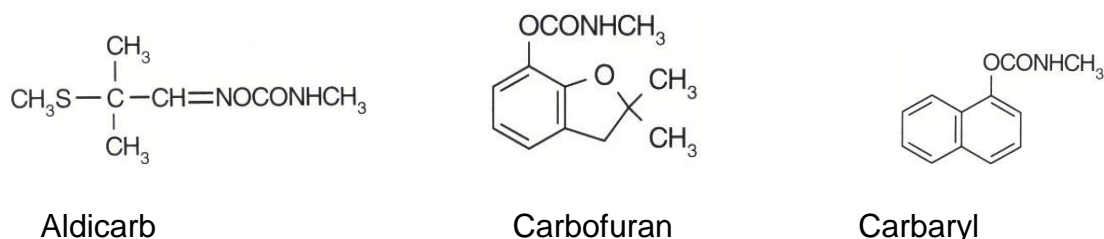
### **OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA PARA DETERMINAÇÃO DE CARBAMATOS EM ÁGUA POR CLAE-UV**

#### **1.1 INTRODUÇÃO**

O uso de inseticidas granulados como os carbamatos, em culturas de batata, citrus, café entre outros, é uma prática comumente adotada, que pode levar à contaminações das águas superficiais e subterrâneas. O uso indiscriminado desses produtos é decorrente de sua eficiente ação sistêmica nas plantas e suas excelentes propriedades praguicidas. Contudo, são extremamente tóxicos a organismos não alvos, incluindo mamíferos, aves e peixes, de maneira que a contaminação de recursos hídricos com resíduos de carbamatos pode colocar em risco não apenas os seres humanos, mas também a fauna aquática [1,2].

A utilização de carbamatos, sem os cuidados necessários, tem contribuído para a degradação ambiental, contaminação dos alimentos e aumento dos casos de intoxicações acidentais. Além desses casos, um outro problema de saúde pública no meio rural brasileiro, são os casos de intoxicações intencionais, suicídios e dos crimes de homicídio [3].

Os carbamatos estão incluídos na lista de poluentes prioritários da United States Environmental Protection Agency (EPA) [4], que devem ter a utilização controlada. Alguns compostos deste grupo, com seus respectivos nomes comerciais são: carbaril (Sevin), aldicarb (Temik), carbofurano (Furadan), e dentre estes o composto aldicarb destaca-se como o principal alvo da lista de agrotóxicos controlados pelo EPA devido à sua elevada toxicidade para mamíferos [4]. As estruturas desses compostos são apresentadas na Figura 1.1.



**Figura 1.1:** Estrutura do Aldicarb, Carbofuran e Carbaryl.

A elevada toxicidade dos carbamatos, mesmo em baixas concentrações, requer um particular interesse na sua determinação em diversas matrizes. A determinação desses carbamatos em diferentes matrizes como água [4,5], solo [6,7,8], ar [9], fluidos biológicos [10], alimentos [11,12] é bem descrita na literatura. Isto reflete a importância destes estudos, pois a intoxicação por esses compostos afetam o sistema nervoso por interrupção da enzima que regula a acetilcolina, um neurotransmissor, podendo levar o organismo à morte [13].

Além disso, atualmente, com a crescente redução na disponibilidade de água potável para as atividades humanas, o monitoramento de agrotóxicos na água, solo e alimentos constitui um indicador importante para garantir que sua utilização seja feita de forma adequada, não colocando em risco as águas naturais e a saúde pública [13,14].

No Brasil, a concentração máxima para carbaryl em água é estabelecida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) sendo igual a 0,02 µg L<sup>-1</sup> e 70,0 µg L<sup>-1</sup> para as Classes I e III, respectivamente [15]. Nesse sentido, alta sensibilidade é requerida nos métodos analíticos. Em análises com interesses forenses, como de alimentos e águas, para investigação de crimes ambientais,

tentativas de homicídios e suicídios, causados pelo uso acidental ou proposital destes compostos, a sensibilidade não é tão relevante, sendo a seletividade o fator mais importante a ser considerado. Entretanto, em matrizes biológicas a análise quantitativa deve ser realizada.

A técnica utilizada, estabelecida por normas internacionais para análise de pesticidas n-metil-carbamatos (NMC) em águas, é a injeção direta da amostra em cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência [16,17]. Uma técnica alternativa para estas análises é a cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE/UV), que tem sido empregada na análise de carbofuran [18,19,20], propoxur [21,22], aldicarb [19,20], carbaryl [22] e metiocarb [20,22] em água e demais matrizes.

Entretanto, para determinar resíduos de agrotóxicos em alimentos e matrizes ambientais, é necessário empregar uma técnica de extração com solvente, seguida por etapas de *clean up* [23]. Assim, novas técnicas de extração têm sido utilizadas com a mesma finalidade como extração em fluido supercrítico [24], microextração em fase sólida [25,26], extração em fase sólida [27,28,29] e dispersão da matriz em fase sólida [30]. De modo geral, os métodos analíticos estão bem estabelecidos para monitoramento ambiental, todavia, a maioria dos procedimentos gera resíduos químicos e conseqüentemente, grande impacto ambiental.

Uma variação da técnica de extração líquido-líquido foi desenvolvida para extração de pesticidas em plantas e tecidos de animais, em que os materiais gordurosos eram separados por precipitação em baixa temperatura [31].

Recentemente, a técnica extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) foi otimizada no Laboratório de Química Analítica- Universidade Federal de Viçosa- (LAQUA-UFV), para análise de piretróides em água e leite [32,33], visando diminuir os impactos ambientais causados pelo uso de solventes orgânicos. Os resultados foram muito promissores para a área da química analítica, pois esta técnica apresenta algumas vantagens em relação às demais técnicas de extração líquido-líquido convencionais, uma vez que é prática, com um número de etapas reduzido e principalmente com um baixo consumo de amostras e de solventes orgânicos.

Neste trabalho procurou-se adaptar, otimizar e validar a técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para



determinação de três carbamatos (aldicarb, carbofuran e carbaryl) em amostras de água por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV). As melhores condições de extração e análise simultânea dos três carbamatos foram otimizadas e posteriormente validadas com relação às principais figuras de mérito: exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação, linearidade, sensibilidade e seletividade.

## 1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.2.1 Equipamentos

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido Shimadzu LC 20AT equipado com um detector UV/VIS Shimadzu SPD 20A, forno da coluna, Shimadzu CTO 10ASVP, injetor automático Shimadzu SIL 10AF; sistema de integração Lab Solutions da Shimadzu; Banho ultra-sônico Maxi Clean 750- Unique (saída de 150 W e frequência de 33 kHz).

### 1.2.2 Condições cromatográficas

As seguintes condições cromatográficas foram ajustadas para determinação simultânea de aldicarb, carbofuran e carbaryl por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência): Coluna Phenomenex Luna 3  $\mu\text{m}$ , C18, 100 A 150 x 4,6 mm; fase móvel: água destilada (filtrada em filtro de 40  $\mu\text{m}$ ): acetonitrila 65:35 v:v, vazão da fase móvel: 0,8 mL min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna: 35 °C e volume de injeção 20  $\mu\text{L}$ . Detector de UV em dois comprimentos de onda (Dual mode) ( $\lambda$ : 195 nm-aldicarb e carbofuran e 213 nm - carbaryl).

### 1.2.3 Reagentes e soluções

As soluções empregadas foram preparadas a partir de padrões de aldicarb (99,9% m/m – Sigma Aldrich), carbaryl (99,8% m/m – Sigma Aldrich), carbofuran (99,9% m/m – Sigma Aldrich), utilizando como solvente acetonitrila (J.T. Baker/ CLAE). O solvente acetonitrila (J.T. Baker, grau CLAE) foi empregado como extrator e eluente. Os solventes metanol (Mallinckrodt, grau CLAE) e acetato de etila (Mallinckrodt, grau CLAE) foram empregados como extratores. Foi utilizado o adsorvente octadecil (C18- PR Cola) para os estudos de comparação de métodos.

As soluções padrão estoque na concentração de 1000,0 mg L<sup>-1</sup> de aldicarb, carbofuran e carbaryl foram preparadas individualmente em acetonitrila (J.T. Baker, grau CLAE) e armazenadas em freezer. A partir de diluições das soluções estoque foi preparada uma solução padrão de trabalho contendo os três carbamatos na concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup>.

### 1.2.4 Preparo de amostras fortificadas

No processo de otimização e validação do método foram utilizadas amostras de água destilada (isentas de agrotóxicos) fortificadas com solução padrão de trabalho contendo os três agrotóxicos (aldicarb, carbofuran e carbaryl) na concentração de 10,0 mg L<sup>-1</sup>. As amostras de água fortificadas foram deixadas em repouso por 3 horas.

### 1.2.5 Otimização da técnica extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura

Nesta técnica a amostra de água é colocada em contato com solvente orgânico, agitada por um tempo a ser determinado e levada ao freezer para separação das fases. Após partição, o extrato orgânico é analisado por cromatografia líquida de alta eficiência.

#### 1.2.5.1 Planejamento fatorial

Para otimização da técnica ELL-PBT foi empregado um planejamento fatorial completo,  $2^3$ , para avaliação do comportamento simultâneo de três fatores: tempo de extração em banho ultrassônico, concentração salina e proporção entre o volume de água e solvente extrator. Os três fatores foram estudados em dois níveis e as análises foram realizadas em duplicata. Os dados do planejamento são mostrados na Tabela 1.1. Os níveis dos três fatores utilizados no planejamento fatorial foram estabelecidos em experimentos prévios. A adição de sal foi utilizada no nível máximo que permitia ainda a existência de uma fase única entre os solventes, água e acetonitrila.

**Tabela 1.1:** Planejamento fatorial  $2^3$  para amostras de água fortificadas ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ )

Fatores codificados			Fatores Originais			
Ensaio	F(1)	F(2)	F(3)	(1) Tempo de extração (min)	(2) Adição de NaCl (% m/v)	(3) Proporção $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (v:v)
1 e 2	-	-	-	2	0	1:1
3 e 4	+	-	-	10	0	1:1
5 e 6	-	+	-	2	1,5	1:1
7 e 8	+	+	-	10	1,5	1:1
9 e 10	-	-	+	2	0	1:2
11 e 12	+	-	+	10	0	1:2
13 e 14	-	+	+	2	1,5	1:2
15 e 16	+	+	+	10	1,5	1:2

Em frasco de vidro transparente com tampa e septo de Teflon®, de 22 mL de capacidade, foram adicionados 2,00 mL de água fortificada com padrões dos três carbamatos em concentração de  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ . A adição de sal das amostras foi mantida em níveis iguais aos previstos no planejamento, pela adição de NaCl. Foram adicionados volumes de 2,00 ou 4,00 mL de acetonitrila, correspondentes aos níveis (-) e (+) do planejamento fatorial. Essa solução foi mantida em banho ultrassônico, por 2 ou 10 min correspondentes aos níveis (-) e (+) do planejamento fatorial. Essas amostras foram deixadas em freezer a  $(-20 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$  por 3 h para separação das fases. Após esse período, foi retirado 1,00 mL da fase orgânica. Esse extrato foi armazenado em frasco de vidro em freezer até o momento da análise cromatográfica.

As melhores condições do planejamento foram avaliadas em função da porcentagens de extração obtidas em cada ensaio. Esses dados foram tratados empregando os programas Excell® e Origin®.

### 1.2.6 Validação do método

A técnica otimizada foi validada com relação aos seguintes parâmetros de desempenho: seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (ensaio de recuperação e comparação de métodos), de acordo com recomendações do International Conference on Harmonization [34] e de outras publicações semelhantes [35-37].

No tratamento estatístico da Linearidade das curvas analíticas, foi realizado o ajuste exploratório dos dados de cada curva pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) [38, 39]. Os valores dispersos foram confirmados e tratados pelo teste dos resíduos padronizados Jackknife, o qual foi aplicado sucessivamente até que novos valores dispersos não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2 % no número original de resultados [40, 41]. Violações das premissas relacionadas à análise de regressão foram avaliadas: normalidade pelo teste de Ryan & Joiner [42], homoscedasticidade pelo teste de Levene modificado [43] e teste de Brown & Forsythe [44] e independência dos resíduos da regressão pelo teste de Durbin & Watson [45]. Testes F foram conduzidos para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação das significâncias da regressão e do desvio da linearidade [46].

A exatidão do método foi avaliada, em triplicata, por ensaios de recuperação em três níveis de concentração e por comparação com dois métodos de extração citados na literatura. O método 1, extração em fase sólida, emprega octadecilsiloxano (C-18) como adsorvente e acetonitrila como eluente, para análise de carbamatos em água [3]. Após condicionamento dos cartuchos (C-18) com 3,0 mL de acetonitrila, alíquotas de 100 mL de água foram introduzidas no cartucho e os compostos adsorvidos eluídos com 3,0 mL de acetonitrila. Após essa etapa, as amostras foram concentradas até 0,9 mL sob fluxo suave de N<sub>2</sub> e adicionado 1,1 mL de água deionizada para reconstituir a proporção da fase móvel (acetonitrila: água 45: 55) e analisadas por CLAE-UV.

O método 2 emprega a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura para determinação de piretróides em água otimizada por Vieira et al, (2007) [32]. Nesse método, a 4,00 mL de água com 0,02 mol L<sup>-1</sup> de NaCl foram adicionados 8,00 mL de acetonitrila. Essa solução foi mantida sob agitação mecânica, em mesa agitadora por 15 min à temperatura ambiente e sob agitação suave. Essas amostras foram deixadas em freezer a aproximadamente -20 °C por 12 h. Após esse período, a fase orgânica líquida foi passada por um papel de filtro com sulfato de sódio anidro sendo o papel de filtro previamente lavado com acetonitrila. A fase aquosa congelada foi descartada e os extratos foram ajustados para 8,00 mL de acetonitrila e analisados por CLAE.

#### 1.2.7 Aplicação da técnica ELL-PBT

O método otimizado e validado foi aplicado para determinação dos agrotóxicos em três amostras de água mineral de diferentes marcas, em água de abastecimento público de Viçosa-MG e em seis amostras de rios da Zona da Mata Mineira, nos municípios de Manhuaçu, Matipó, Raul Soares e São José do Goiabal. A coleta foi realizada nos períodos de junho a julho de 2009, a uma profundidade de aproximadamente 50 centímetros da superfície das águas, em períodos sem chuvas e fora da época de plantio. Informações sobre as aplicações de agrotóxicos sobre as culturas também foram observadas. Na região de Manhuaçu, Matipó, Raul Soares predomina o cultivo de café e frutas cítricas, já em São José do Goiabal apenas culturas para subsistência.

As amostras coletadas em frascos de vidro, sendo os recipientes previamente higienizados com detergente, enxaguados com água de torneira e destilada, solução alcoólica, e finalmente rinsados por 2 vezes com a própria amostra na hora da coleta, a fim de evitar contaminação por fontes externas. No momento da coleta foram determinadas as condições de pH, temperatura da água, bem como temperatura do ar. As amostras foram colocadas em frascos de vidro âmbar (com capacidade de 1000 mL) fechados com tampas de rosca. Os frascos foram identificados e conservados em caixa de isopor com gelo até o acondicionamento final e mantidos sob refrigeração a 4 °C, até o momento da análise, que foi aproximadamente 48 h após a coleta.

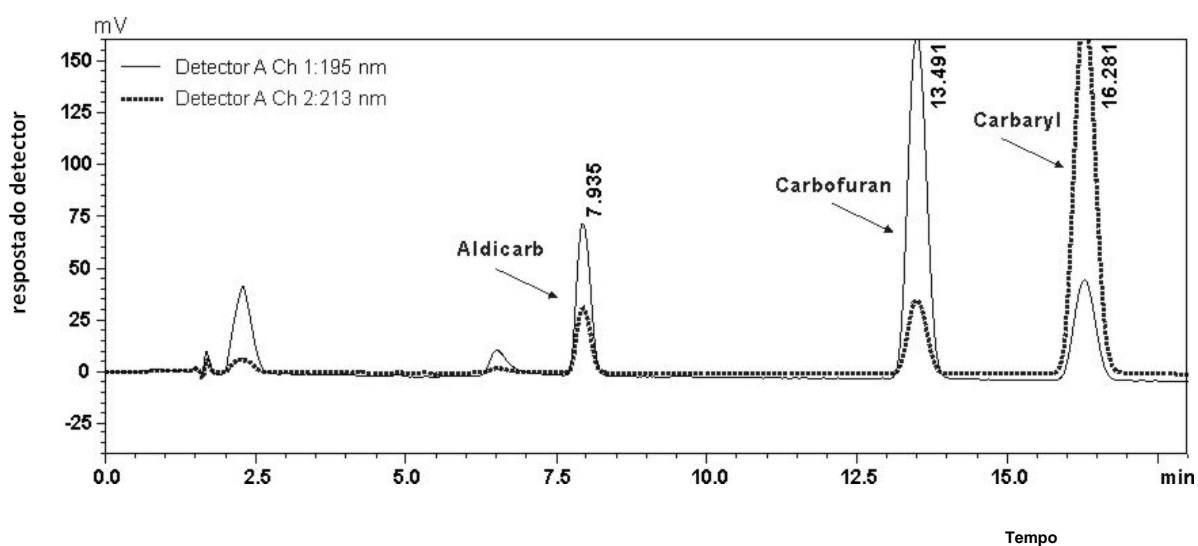
Posteriormente estas amostras foram fortificadas com os carbamatos (4,0 mg L<sup>-1</sup>) e analisadas para mostrar a eficiência do método para amostras reais.

### 1.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 1.3.1 Análise cromatográfica

As condições cromatográficas otimizadas para análise simultânea dos carbamatos permitiram boa separação dos princípios ativos conforme pode ser observado no cromatograma apresentado na Figura 1.2.

Os picos, com tempos de retenção ( $t_R$ ) iguais a 7,935; 13,491 e 16,281 min correspondem à aldicarb, carbofuran e carbaryl, respectivamente.



**Figura 1.2.** Cromatogramas de uma solução padrão a 5,0 mg L<sup>-1</sup> de aldicarb ( $t_R = 7,935$  min), carbofuran ( $t_R = 13,491$  min), e carbaryl ( $t_R = 16,281$  min) em acetonitrila, a 195 nm (\_\_\_\_) e 213 nm (-----).

Em função da máxima absorção apresentada pelos compostos na região do ultravioleta, as análises foram feitas com detecção simultânea em dois comprimentos de onda. O comprimento de onda de absorção para aldicarb e

carbofuran foi de 195 nm e para carbaryl de 213 nm. O tempo total de análise dos carbamatos foi de 18 minutos.

### 1.3.2 Otimização da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura

No processo de otimização da técnica de extração e análise dos três carbamatos, os efeitos de três fatores foram avaliados simultaneamente: o tempo de extração em banho ultrassônico, a concentração salina e a proporção entre o volume de água e acetonitrila. Nessa avaliação, um planejamento fatorial  $2^3$  foi conduzido e os efeitos avaliados pelas porcentagens de recuperação. Os ensaios, realizados em duplicata, geraram 16 respostas que permitiram estimar os erros experimentais associados à determinação de cada resposta média. Com essas repetições foi possível, usando os programas Excell® e OriginPro®, calcular as porcentagens de recuperação média, os efeitos de cada fator e as interações entre os fatores na extração de cada um dos carbamatos. Os erros associados a cada efeito e suas interações foram avaliados pelo teste t para 95% de probabilidade ( $\alpha = 0,05$ ) e 8 repetições ( $n = 8$ ). Os resultados da análise estatística são apresentados na Tabela 1.2.



**Tabela 1.2.** Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores ( $\pm$  estimativa do erro experimental) na extração de cada um dos carbamatos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de água, pelo método ELL-PBT

	Aldicarb	Carbofuran	Carbaryl
Recuperação média (%)	90,0 $\pm$ 1,1	96,0 $\pm$ 1,6	97,0 $\pm$ 1,5
(1) Banho ultrassônico	1,8 $\pm$ 1,7	2,6 $\pm$ 2,0	<b>5,3* <math>\pm</math> 1,9</b>
(2) Adição de NaCl	<b>4,6* <math>\pm</math> 1,7</b>	4,1 $\pm$ 2,0	3,6 $\pm$ 1,9
(3) Proporção H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> CN	<b>17,8* <math>\pm</math> 1,7</b>	<b>13,8* <math>\pm</math> 2,0</b>	<b>12,1* <math>\pm</math> 1,9</b>
(1) e (2)	-0,1 $\pm$ 1,7	0,8 $\pm$ 2,0	0,8 $\pm$ 1,9
(1) e (3)	0,6 $\pm$ 1,7	2,1 $\pm$ 2,0	2,8 $\pm$ 1,9
(2) e (3)	0,8 $\pm$ 1,7	0,6 $\pm$ 2,0	0,1 $\pm$ 1,9
(1) e (2) e (3)	-2,3 $\pm$ 1,7	-0,1 $\pm$ 2,0	-0,6 $\pm$ 1,9

\*( $\alpha > 0,05$ ) Os números em negrito correspondem a resultados significativos em nível de 95% de probabilidade pelo teste t

Os resultados da Tabela 1.2 mostram que, nos níveis avaliados, não houve interação significativa entre os fatores ao nível de 95% de probabilidade pelo teste t.

Um maior tempo de banho ultrassônico, aumenta em 5,3% a eficiência de extração do carbaryl. O aumento da eficiência da extração com auxílio do banho ultra-sônico também foi observado por Pinho et al. (2009) e Alberio et al. (2005) na extração de agrotóxicos em tomate e sucos de tomate, respectivamente [30, 47]. As porcentagens de recuperação do aldicarb e do carbofuran não foram alteradas pelo aumento do tempo do banho ultra-sônico.

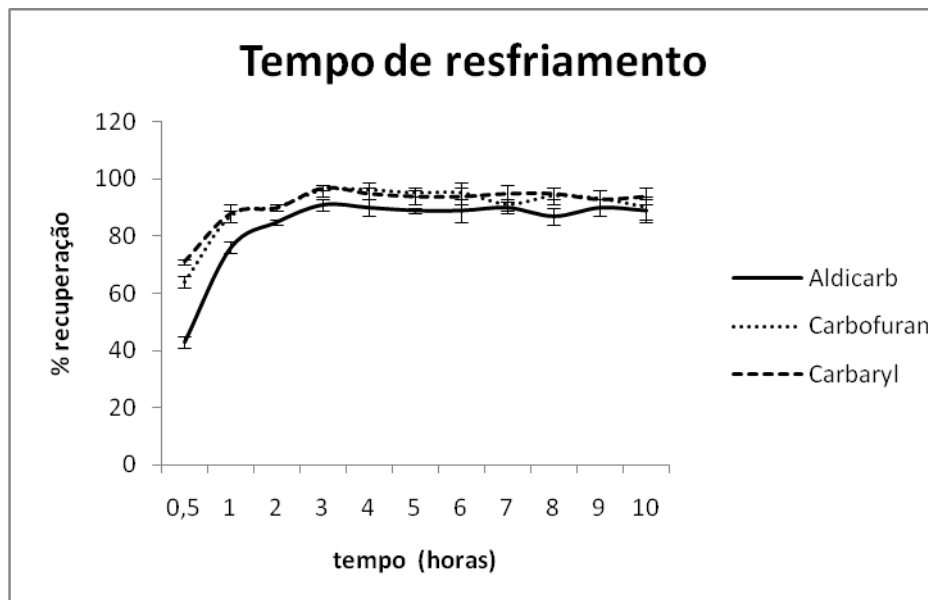
A adição de sal no meio aumentou a porcentagem de recuperação do aldicarb em 4,6%. Esse efeito positivo é devido à solvatação dos íons pelas moléculas de água, facilitando a migração dos carbamatos para a fase orgânica. Para o carbofuran e carbaryl, houve um aumento na porcentagem de

extração de 4,1 e 3,6%, respectivamente, embora este não tenha sido considerado significativo.

A proporção do volume do solvente acetonitrila em relação ao volume de amostra, de 1:1 para 1:2 (v/v) (amostra:acetonitrila), aumentou o rendimento de extração de 17,8% para aldicarb, de 13,8% para carbofuran e de 12,1% para carbaryl. Resultados semelhantes para proporção solvente e amostra foram encontrados na otimização da técnica de ELL-PBT para piretróides em água [32]. Pelos resultados obtidos da análise estatística, Tabela 1.2, os ensaios 15 e 16 que correspondem aos fatores tempo de banho ultrassônico de 10 min, concentração de NaCl igual a 1,5% m/v, e proporção amostra:acetonitrila 1:2 v/v foram os escolhidos para dar continuidade ao desenvolvimento da otimização e validação do método proposto.

### 1.3.3 Eficiência da partição em baixa temperatura

O método de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT), conforme relatado [32,33] apresenta um pequeno inconveniente, o tempo para congelamento da fase aquosa. No sentido de melhorar a frequência analítica do método, procurou-se avaliar a eficiência da partição na separação das fases pelo abaixamento da temperatura. A separação das fases acontece com o abaixamento da temperatura e após um período de 6 horas ocorre o congelamento da fase aquosa. Acreditando que a transferência do soluto para fase orgânica acontece predominantemente antes do congelamento da fase aquosa, procurou-se quantificar esta transferência do analito em função do tempo de resfriamento. Os resultados são apresentados na Figura 1.3.



**Figura 1.3:** Porcentagens de recuperação dos carbamatos em função do tempo de resfriamento no freezer (-20 °C).

Observou-se que um tempo de resfriamento abaixo de 2 horas a porcentagem de recuperação é menor para os três carbamatos. A partir de 3 horas, o equilíbrio de partição foi estabelecido e a porcentagem de extração permaneceu praticamente constante, possivelmente em função do estabelecimento de equilíbrio químico entre analitos, fases orgânica e aquosa, não sendo observadas diferenças significativas ao nível de 95% de probabilidade pelo teste t. Desta forma, foi estabelecido um tempo de partição de 3 horas a  $(-20 \pm 5)$  °C.

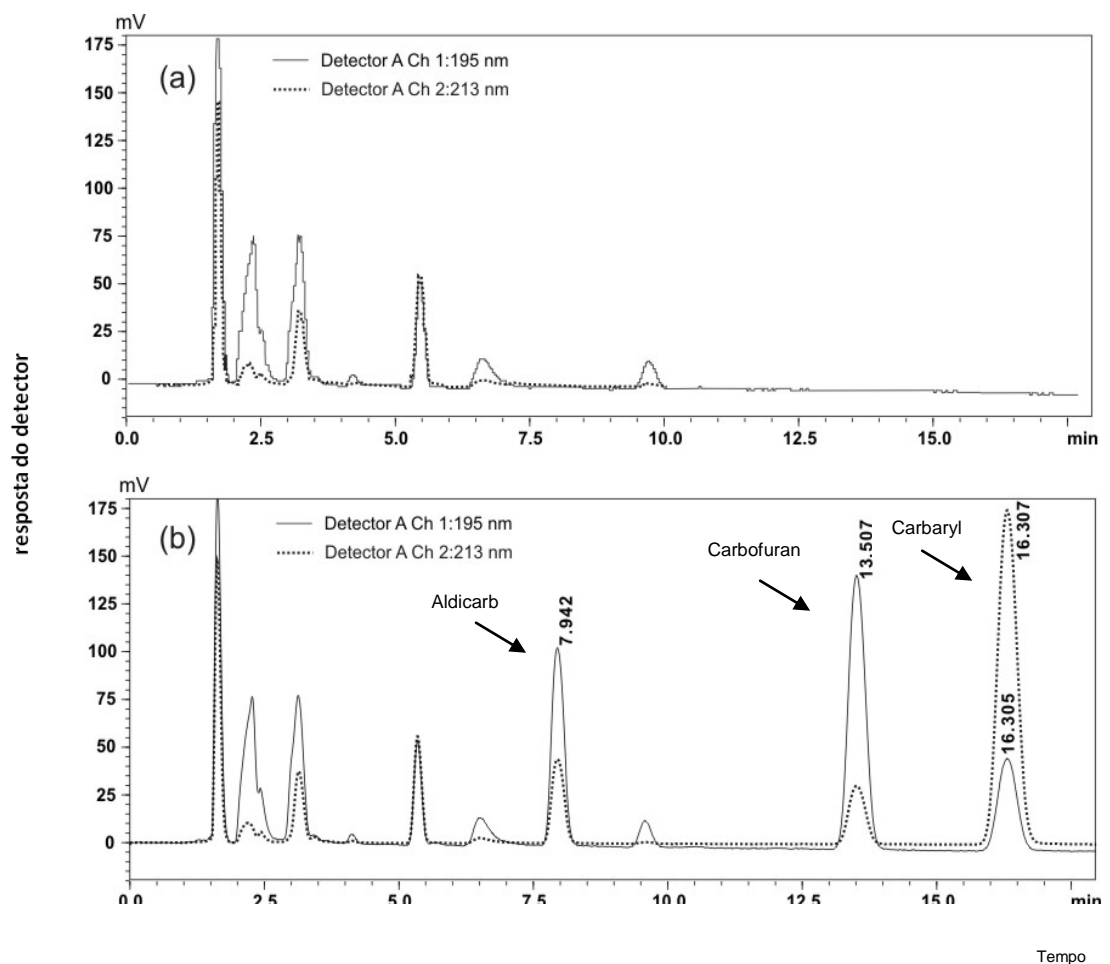
#### 1.3.4 Método ELL-PBT otimizado

O método otimizado para determinação de carbamatos em água consiste na extração de 2,00 mL de água contendo 1,5% de NaCl com 4,00 mL de acetonitrila. Essa solução é mantida em banho ultrassônico por 10 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.

### 1.3.5 Validação do método otimizado

#### 1.3.5.1 Seletividade

A seletividade do método foi comprovada por comparação dos cromatogramas obtidos de amostras de água fortificadas com amostras livres de carbamatos (Figura 1.4). As amostras não apresentaram picos nos tempos de retenção dos carbamatos, além disso, os cromatogramas dos extratos apresentam uma resolução cromatográfica satisfatória.



**Figura 1.4:** (a) - Cromatograma de um extrato obtido de água mineral isenta dos princípios ativos e (b) - cromatograma de um extrato de água mineral contendo os carbamatos a  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ .

### 1.3.5.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Para determinação dos valores do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método, foram realizadas várias injeções dos extratos, fortificados em concentrações decrescentes. 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. Os limites de detecção para aldicarb, carbofuran e carbaryl foram respectivamente  $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$  e os limite de quantificação foram respectivamente  $33,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $33,0 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $17,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . Esses limites atendem a demanda de análises de interesse forense e permitem detectar a presença de carbamatos em amostras ambientais [15].

No Brasil, a concentração máxima para carbaryl em água estabelecida pelo CONAMA é igual a  $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $70,0 \mu\text{g L}^{-1}$  para as Classes I e III, respectivamente [15]. Para aldicarb e carbofuran os limites são estabelecidos para águas subterrâneas de consumo humano, sendo  $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$  para soma de aldicarb, aldicarb sulfóxido e aldicarb sulfona e  $7,0 \mu\text{g L}^{-1}$  para carbofuran [48].

Nesse sentido, alta sensibilidade é requerida nos métodos analíticos. Entretanto, em análises forenses, para investigação de crimes ambientais, tentativas de homicídios e suicídios, causados pelo uso acidental ou proposital destes compostos essa sensibilidade não é tão relevante. Os limites de detecção e quantificação dos carbamatos em amostras brutas, não são alvo dos métodos analíticos desenvolvidos para fins criminalísticos. O interesse forense nesse caso está associado à precisão, seletividade, exatidão, rapidez e baixo custo. O método de extração proposto utiliza apenas 4 mL de solvente orgânico, mostrando-se eficiente, seletivo e de baixo custo.

### 1.3.5.3 Sensibilidade e linearidade

Avaliou-se a linearidade de resposta do detector injetando soluções de cada um dos carbamatos em uma ampla faixa de concentração (0,033 a 500 mg L<sup>-1</sup>). Para cada carbamato foi construída uma curva analítica e os coeficientes de correlação foram superiores a 0,99 para os três carbamatos.

A faixa de trabalho utilizada foi de 0,033 mg L<sup>-1</sup> a 5,0 mg L<sup>-1</sup>. Essa faixa foi construída no branco da matriz e também em solvente puro. Os cálculos da eficiência das extrações na otimização do método foram realizados empregando a curva analítica construída no branco da matriz. Os coeficientes de correlação (r) foram superiores a 0,99 para os três carbamatos (Tabela 1.3)

**Tabela 1.3:** Equações da reta e coeficientes de correlação dos carbamatos nas curvas analíticas construídas a partir de soluções preparadas em solvente e no branco da matriz

	Aldicarb	r	Carbofuran	r	Carbaryl	r
Solvente	Y= 259381x+2228.1	0.9999	y = 796523x + 6278.9	1.000	y = 968347x + 17559	0.9997
Branco da matriz	y = 262377x -443.76	0.9998	y = 810653x - 7707.5	0.9998	y = 969824x - 7938	0.9999

Pode-se verificar que através dos coeficientes angulares (Tabela 1.3) que o detector ultravioleta (UV) é mais sensível ao carbaryl e ao carbofuran que ao aldicarb. Esta sensibilidade está relacionada provavelmente à presença de maiores sítios de absorção da radiação ultravioleta na estrutura química do carbaryl e carbofurano (Figura 1.1), os quais contêm anel benzênico e carbonila, enquanto que na estrutura do aldicarb pode ser verificado além da carbonila apenas elétrons  $\pi$ .

A linearidade foi confirmada para as todas as curvas (em solvente e no branco da matriz) preparadas nesse trabalho. Todos os valores dispersos identificados foram confirmados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, não sendo observadas tendências nos gráficos exploratórios dos resíduos das regressões, após o tratamento dos dados. A premissa de que os resíduos da

regressão devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner [42]. Os coeficientes de determinação obtidos foram superiores a 0,99. Estes resultados indicaram que o desvio da normalidade não foi significativo ( $p > 0,10$ ), permitindo o uso dos testes de hipóteses de t e F. A variabilidade dos resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração estudados foi constante, demonstrando homoscedasticidade. A estatística t de Levene não foi significativa ( $p > 0,05$ ) em todas as curvas examinadas. Independência dos resíduos da regressão foi evidenciada pelo teste de Durbin-Watson [45], uma vez que as distribuições dos pontos não apresentaram tendências positivas ou negativas. Assim, o uso do MMQO foi adequado para estimativa dos parâmetros das regressões.

No Anexo 1 estão os dados do tratamento estatístico da linearidade para a curva analítica do aldicarb preparada em solvente.

#### 1.3.5.4 Precisão

Para este estudo foram empregadas amostras de água fortificadas com os padrões dos carbamatos a  $66 \mu\text{g L}^{-1}$ . A precisão do método de ELL-PBT para os três carbamatos estudados em amostras de água, sob condições de repetibilidade, foi avaliada pela estimativa do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV) de nove repetições do procedimento analítico otimizado, no mesmo dia, mesmo analista, mesmo laboratório e equipamento.

Na precisão intermediária avaliou-se os coeficientes de variação de resultados de nove repetições, sendo utilizado o mesmo procedimento em datas diferentes (1 dia; 1 semana e 1 mês).

As porcentagens de recuperação obtidas (%R) e os coeficientes de variação (CV) estão apresentados na Tabela 1.4.

**Tabela 1.4:** Porcentagens de recuperação, (%R), e coeficientes de variação, CV (%), obtidos da aplicação do método ELL-PBT, com nove repetições, em amostras de água fortificadas com carbamatos, ( $66 \mu\text{g L}^{-1}$ ), em diferentes dias

	Recuperação (%) e CV (%)					
	aldicarb		carbofuran		carbaryl	
Dia 1	91,0	11,5	96,3	5,5	96,8	4,6
1 semana	89,8	11,3	94,7	8,5	97,5	3,2
1 mês	89,6	11,7	95,3	7,9	96,4	4,8

Os resultados obtidos para repetibilidade e precisão intermediária confirmam que a técnica de extração e de análise dos carbamatos em água otimizada é precisa, apresentando resultados de recuperação estatisticamente iguais ao nível de 95% de probabilidade pelo teste t para os três princípios ativos estudados. Observa-se para o carbaryl, carbofuran e aldicarb, valores de coeficientes de variação inferiores a 5%, 9% e 11,8%, respectivamente.

Observa-se nesses ensaios que a porcentagem de recuperação foi ligeiramente menor para o aldicarb do que para o carbofuran e carbaryl. O pKa dos compostos influencia na porcentagem de extração dos mesmos. O aldicarb que apresenta um pKa próximo a 2,9 [49] não sofre muita influência do pH da amostra de água (entre 5,8 e 6,1) durante a extração, uma vez que, o mesmo encontra-se na forma ionizada, apresentando uma porcentagem de extração menor. Na forma ionizada, esse composto apresenta um caráter mais polar, sendo mais solúvel em fase aquosa. O carbofuran e o carbaryl, possuem valores de pKa de 11,9 e 10,4 respectivamente [50]. Devido a essas características, esses compostos permanecem em suas formas protonadas até valores de pH próximos de 9,0, sendo mais facilmente extraídos pelo solvente orgânico, uma vez que o caráter menos polar é apresentado por esses carbamatos.



### 1.3.5.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada, em triplicata, por ensaios de recuperação em três níveis de concentração (33,0; 66,0 e 330  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e por comparação com outros métodos de extração. Assim, os ensaios de recuperação foram feitos extraindo-se os compostos em estudo, presentes em matrizes de água, segundo a técnica proposta. Os resultados obtidos para extração dos carbamatos aldicarb, carbofuran e carbaryl em água, bem como os respectivos coeficientes de variação estão apresentados na Tabela 1.5.

**Tabela 1.5** Porcentagens de recuperação, (%R), e coeficientes de variação, CV (%), obtidos da extração de carbamatos em amostras de água fortificadas, em triplicata, pela técnica de ELL-PBT

Concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Recuperação (%) e CV (%)					
	aldicarb		<i>carbofuran</i>		carbaryl	
33,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	89,5	11,3	95,3	5,5	94,6	6,6
66,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	89,9	6,1	94,7	6,3	95,5	6,0
330,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	90,6	7,8	95,7	5,9	96,4	8,2

Esses resultados não diferem entre si, em nível de 95% de probabilidade pelo teste t, mostrando que a porcentagem de recuperação independe do nível de concentração dos analitos na amostra.

Os resultados obtidos empregando-se a ELL-PBT foram comparados com os obtidos por dois métodos descritos na literatura, para extração de carbamatos [3] (Método 1) e demais agrotóxicos [32] (Método 2) em água. Os resultados estão dispostos na Tabela 1.6.

**Tabela 1.6:** Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação, CV (%), obtidos de extrações dos carbamatos em amostras de água fortificadas (4 mg L<sup>-1</sup>), em triplicata, usando a ELL-PBT e dois métodos

	Recuperação (%) e CV (%)					
	aldicarb		carbofuran		carbaryl	
Método 1	93,0	10,8	98,3	9,5	98,8	9,1
Método 2	90,8	9,8	94,7	9,5	96,5	7,2
ELL-PBT	89,6	11,8	95,3	6,9	95,9	4,2

O método 1 consiste basicamente de uma extração em fase sólida utilizando como adsorvente um cartucho contendo octadecilsiloxisano (C-18) e como eluente a acetonitrila [3]. Essa técnica de extração é muito citada na literatura para análise de carbamatos em amostras de água. O método 2 consiste na extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura [32]. Esse método foi desenvolvido para análise de piretróides em água e leite, utilizando o dobro do volume de amostra (4 mL) e solvente (8 mL) que o método otimizado nesse trabalho, mas mantendo a mesma proporção entre amostra e solvente.

Os resultados obtidos da porcentagem de recuperação para cada carbamato pelos métodos 1 e 2 foram equivalentes, não havendo diferença significativa ao nível de 95% probabilidade pelo teste t, entre esses métodos e o método proposto.

Embora não tenha diferença significativa entre os resultados, observa-se que os carbamatos apresentaram uma maior eficiência de extração no método 1. Além disso, esse método apresenta como vantagem o fator de pré-concentração das amostras de água, que é de aproximadamente 100 vezes. Entretanto, entre os métodos avaliados, a ELL-PBT otimizada apresenta menor consumo de solvente (4 mL) e não necessita de etapas de evaporação e eluição da amostra. O método 1 é um método mais caro em relação aos demais, em função do adsorvente utilizado, além disso, é um método trabalhoso, com um número maior de etapas.

Em relação ao método 2, a redução do volume de solvente no método proposto é um fator a ser considerado. Com isso são reduzidos os riscos de contaminação ambiental e custos de análise. Além disso, o método 2 apresenta etapas de congelamento e filtração da amostra com posterior aferição de volume do extrato. O método proposto dispensa congelamento da amostra e posteriores etapas de filtração e aferição de volume, uma vez que 1,0 mL da fase orgânica é recolhido diretamente do frasco após partição em freezer por 3 horas. Com a redução dessas etapas, aumenta-se a frequência analítica.

No monitoramento ambiental, existem vários métodos analíticos [5-8, 16] entretanto, a maioria dos métodos utiliza grandes volumes de solventes e adsorventes, gerando resíduos químicos causando, conseqüentemente, grandes impactos ambientais. Além disso, na maioria dos casos possuem um grande número de etapas com conseqüente exposição do analista a substâncias tóxicas. A técnica proposta é uma alternativa eficiente, com utilização de pequeno volume de solvente (4 mL) e reduzido número de etapas de execução, minimizando os impactos ambientais, diminuindo o custo de análise e oferecendo uma maior segurança no trabalho do analista.

### 1.3.6 Aplicação do método

O método de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura, depois de otimizado e validado, foi aplicado em 3 amostras de água mineral, em água de abastecimento público de Viçosa-MG em amostras de águas coletadas em rios da Zona da Mata Mineira, nos municípios de Manhuaçu, Matipó, Raul Soares, em um córrego em São José do Goiabal. As amostras foram coletadas em diferentes pontos dos rios e córregos e determinados os seguintes parâmetros no momento da coleta: pH, temperatura da água e do ambiente. O pH variou entre 5,0 a 6,5, a variação da temperatura da água foi de 17 a 21 °C e a temperatura ambiente manteve-se entre 21 a 25 °C. As análises foram realizadas em triplicatas. Não foi constatada a presença de resíduos de nenhum dos agrotóxicos aldicarb, carbofuran e carbaryl nas amostras de água mineral, abastecimento público e também nas coletadas nos rios e córregos da Zona da Mata Mineira, ou se encontravam em concentrações inferiores ao limite de detecção do método.

A meia-vida dos carbamatos no ambiente é relativamente curta (horas a dias) variando em função das condições do meio [51]. Deste modo, uma forma de aumentar a probabilidade de detectar contaminação nos recursos hídricos seria coletar as amostras no período em que a aplicação de agrotóxicos coincidissem com o período de chuvas mais intensas na região da coleta, pois nos períodos chuvosos, espera-se um aumento das pragas com um conseqüente aumento da aplicação de agrotóxicos.

Após a obtenção dos resultados da análise da água coletadas nos rios da Zona da Mata Mineira e constatado a isenção dos agrotóxicos em estudo, três amostras de água dos rios que apresentavam um aspecto mais turvo em razão do material particulado, foram contaminadas com quantidades conhecidas ( $4 \text{ mg L}^{-1}$ ) dos três agrotóxicos.

Posteriormente, sem nenhum tratamento prévio, estas amostras naturais foram submetidas ao procedimento de extração otimizado e validado. Esse procedimento foi realizado para avaliar a eficiência da técnica ELL-PBT e o efeito de matriz (Tabela 1.7). A técnica ELL-PBT se mostrou igualmente eficiente para amostras reais e nenhum efeito de matriz foi verificado.

**Tabela 1.7:** Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação, CV (%), obtidos de extrações dos carbamatos em três amostras de água de rios fortificadas ( $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), em triplicata, usando a ELL-PBT

	Recuperação (%) e CV (%)					
	aldicarb		carbofuran		carbaryl	
Amostra de rio 1	89,0	10,8	96,3	8,9	98,3	10,0
Amostra de rio 2	90,1	8,8	94,9	8,2	95,5	7,2
Amostra de rio 3	89,6	9,8	95,3	7,9	95,9	7,2

## 1.4 CONCLUSÕES

A otimização da ELL-PBT, para extração de carbamatos em água e análise por CLAE-UV, resultou em um método rápido, eficaz, seletivo e de baixo custo, uma vez que o consumo de solvente orgânico utilizado foi mínimo (4,0 mL). Além disso, o método proposto apresentou porcentagens de recuperação elevadas para os três carbamatos (superiores a 90%). O método de extração e análise foi validado com resultados satisfatórios, podendo ser aplicado para detectar esses princípios ativos em amostras ambientais (Águas de Classe III) e em análises forenses.

## 1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] L. Larine, In: Toxicologia dos Praguicidas. Editora Manole Ltda. São Paulo, 1999.
- [2] P. Okumura, K. Imamura, Y. Nishikawa, *Analyst* 120 (1995) 2675-2681.
- [3] M. R. S. Moreira, J. L. N. Mucci, R. B. Abakerli, *Arq. Inst. Biol.* 71 (2004) 221-226.
- [4] U.S. Environmental Protection Agency, National Survey of Pesticides in Drinking WaterWells, Phase II Report, EPA 570/9-91-020, 1992.
- [5] D. A. Lambropoulou, T. A. Albanis, *J. Chromatogr. A* 1072 (2005) 55-61.
- [6] L. L. El Atrache, S. Sabbah, J. P. Morizur, *Talanta* 65 (2005) 603-612.
- [7] C. Sánchez-Brunete, A. Rodriguez, J. L. Tadeo, *J. Chromatogr. A* 1007 (2003) 85-91.
- [8] C. Basheer, A. A. Alnedhary, B. S. M. Rao, R. Balasubramanian, H. K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 211-216.
- [9] L. Sun, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1014 (2003) 165-177.
- [10] H. P. Li, J. H. Li, G. C. Li, J. F. Jen, *Talanta* 63 (2004) 547-553.
- [11] D. B. Barr, J.R. Barr, V.L. Maggio Jr., R. D. Whitehead, M.A. Sadowski, R.M. Whyatt, L.L. Needham, *J. Chromatogr. B* 778 (2002) 99-111.
- [12] K. Granby, J. H. Andersen, H. B. Christensen, *Anal. Chim. Acta* 520 (2004) 165-176.
- [13] S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, A. Laganà, M. Nazzari, M. Tonci, *J. Chromatogr. A* 1054 (2004) 351-357.

- [14] U.S.Environmental Protection Agency, Types of Pesticides, <<http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>>
- [15] Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA, Resolução No. 357 de 17 de março de 2005 <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>
- [16] U. S. Environmental Protection Agency. Methods for the determination of organic compounds in drinking water. Cincinnati, 1991.
- [17] U. S. Environmental Protection Agency. Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods (SW-846): Updates I, II, and IIA. 3. ed. Springfield: NTIS, 1994.
- [18] K. W. Beauchamp, D. D. W. JR. Liu, E. J. J. JR. Kikita, J. Assoc. Anal. Chem. 72 (1989) 845-847.
- [19] R. J. Bushway, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 49 (1992) 1-9.
- [20] P. Parrila, Fresenius J. Anal. Chem. 350 (1994) 633-637.
- [21] Y. J. Kumar, Environ. Sci. Health B18 (1983) 757-765.
- [22] J. M. Tovar, M. J. S. Delgado, Anales de Química 91 (1995) 365-373.
- [23] Z. Sharif, Y. B. C. Man, N. S. A. Hamid, C. C. Keat, J. Chromatogr. A 1127 (2006) 254-261.
- [24] G. S. Nunes, T. C. R. Santos, D. Barceló, A. S. Pimenta, M. L. Ribeiro, Quím. Nova 25 (2002) 214-220.
- [25] A. Sanusi, V. Guilet, M. Montury, J. Chromatogr. A 1046 (2004) 35-40.
- [26] L. J. Krutz, S. A. Senseman, A. S. J. Sciumbato, J. Chromatogr. A 999 (2003) 103-121.
- [27] B. Alberio, C. S. Brunete, J. L. Tadeo, Talanta 66 (2005) 917-924.
- [28] F. M. Lanças, Extração em Fase Sólida, Editora Rima, São Carlos, 2004.
- [29] Y. F. Picó, M. M. J. Ruiz, G. J. Font, Biochem. Biophys. Methods 70 (2007) 117-131.
- [30] G. P. Pinho, A. A. Neves, e M. E. L. R. Queiroz, Quím. Nova 32 (2009) 92-98.
- [31] R. K. Jhuhler, J. Chromatogr. A 786 (1997) 145-153.
- [32] H. P. Vieira, A. A. Neves, M. E. L. R. Queiroz, Quím. Nova 30 (2007) 535-540.
- [33] S. M. Goulart, M. E. L. R. Queiroz, A. A. Neves, J. H. Queiroz, Talanta 75/5 (2008) 1320-1323.

- [34] International Conference on Harmonisation (ICH), Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95) (1995).
- [35] INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008 (2003).
- [36] M. Ribani, C. B. G. Bottoli, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, L. F. C. Melo, Quím. Nova 27 (2004) 771-780.
- [37] F. M. Lanças, Validação de Métodos Cromatográficos de Análise, Editora Rima, São Carlos, 2004.
- [38] P. C. Meyer, R. E. Zund, Statistical methods in analytical chemistry. New York: John Wiley & Sons, 1993. p. 81-134.
- [39] S. V.C. Souza, R. G. Junqueira, Anal. Chim. Acta 552 (2005) 25–35.
- [40] D. A. Belsley, E. Kuh, R. E. Welsch, Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity. New York: Wiley, 1980.
- [41] W. Horwitz, Pure Appl. Chem 67 (1995) 331-343.
- [42] T. A. Ryan, B. L. Joiner, Normal probability plots and tests for normality. The State College: Pennsylvania State University, 1976.
- [43] H. Levene, Robust tests for equality of variances. In: Olkin, I.; Ghurye, S.G.; Hoeffding, W.; Madow, W.G.; Mann, H.B. (Ed.) Contributions to probability and statistics. Stanford: Stanford University Press, 1960.
- [44] M. B. Brown, A. B. Forsythe, J. Am. Stat. Assoc. 69 (1974). 364-367.
- [45] J. Durbin, G. S. Watson, Biometrika 38 (1951) 159-178.
- [46] N. Draper, H. Smith, Applied regression analysis. New York: Wiley. 1998.
- [47] B. Albero, C. S. Brunete, J. L. Tadeo, J. Chromatogr. A 1007 (2003) 137-143.
- [48] RESOLUÇÃO CONAMA 396, de 3 de abril de 2008  
<[http://www.silviminas.com.br/Legislacao/Arquivos/legislacao\\_441.pdf](http://www.silviminas.com.br/Legislacao/Arquivos/legislacao_441.pdf)>
- [49] A. Krueve, A. Kunnapas, K. Herodes, I. Leito, J. Chromatogr. A 1187 (2008) 58-66.
- [50] C. PRZYBYLSKI, V. J. BONNET, Chromatogr. A 1216 (2009) 4787.
- [51] WHO. Environmental Health Criteria. Who Technical Report Series, N. 53, (1989). <[http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest53\\_e.htm](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest53_e.htm)>

## **CAPÍTULO 2**

### **OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA PARA DETERMINAÇÃO DE CARBAMATOS EM BEBIDAS DE INTERESSE FORENSE**

#### **2.1 INTRODUÇÃO**

Os carbamatos são agrotóxicos que se destacam em função de sua alta toxicidade para mamíferos e sua utilização ilegal e indiscriminada [1, 2]. Alguns compostos deste grupo, com seus respectivos nomes comerciais são: carbaryl (Sevin®), aldicarb (Temik®), carbofuran (Furadan®), e dentre estes o composto aldicarb destaca-se como o principal alvo da lista de agrotóxicos controlados pelo United States Environmental Protection Agency (EPA) devido à sua elevada toxicidade para mamíferos [3, 4].

Esses compostos são comumente encontrados em alimentos e bebidas nos casos de intoxicação acidental ou intencional em investigações criminais [5]. As formulações comerciais desses agrotóxicos apresentam coloração acinzentada e em função disso, alimentos e bebidas de coloração escura, como sucos e achocolatados, são frequentemente empregados como veículos de envenenamento.

Geralmente os métodos analíticos utilizados para determinação de carbamatos em diversas matrizes envolvem etapas laboriosas, consumindo



tempo de análise e necessitando de procedimentos de derivatização [6] que não são aplicáveis em casos de emergência relacionados às intoxicações graves [5]. A técnica extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) [7] foi otimizada no Laboratório de Química Analítica (LAQUA), Universidade Federal de Viçosa, MG Brasil, para análise de piretróides em água e leite [8,9]. Os resultados obtidos são promissores para a área da química analítica, pois esta técnica apresenta vantagens em relação às demais técnicas de extração, como praticidade, número de etapas reduzido, baixo consumo de solventes orgânicos, além de ser confiável e seletiva.

A busca por métodos mais eficazes para determinar resíduos de agrotóxicos deve ser estimulada tanto sob o ponto de vista ambiental como da toxicologia analítica [5, 10, 11, 12]. A identificação desses compostos em diferentes matrizes como também a sua quantificação é de interesse na área criminal uma vez que tem crescido significativamente o número de intoxicações com humanos [3, 5, 13- 16] e animais [17, 18].

O objetivo principal deste trabalho foi otimizar e validar a técnica ELL-PBT para determinação dos carbamatos aldicarb, carbofuran e carbaryl em bebidas de interesse forense (suco de uva e bebida láctea achocolatada) por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV).

## **2.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.2.1 Equipamentos**

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido Shimadzu LC 20AT equipado com um detector UV/VIS Shimadzu SPD 20A, forno da coluna, Shimadzu CTO 10ASVP, injetor automático Shimadzu SIL 10AF; sistema de integração Lab Solutions da Shimadzu; Banho ultra-sônico Maxi Clean 750- Unique (saída de 150 W e frequência de 33 kHz); Mesa agitadora (Tecnal TE – 420, São Paulo, Brasil) a 25 °C e 175 oscilações por minuto; e vortex (Certomat® MV).

### **2.2.2 Condições cromatográficas**

As seguintes condições cromatográficas foram ajustadas para determinação simultânea de aldicarb, carbofuran e carbaryl por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência): Coluna Phenomenex Luna 3um C18, 100 A 150 x 4,6 mm; fase móvel: água purificada: acetonitrila 65:35 v:v, vazão da fase móvel: 0,8 mL min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna: 35 °C e volume de injeção 20 µL. Detector de UV (λ: 195 nm-aldicarb e carbofuran e 213 nm - carbaryl).

### 2.2.3 Reagentes e soluções

As soluções padrão estoque na concentração de 1000,0 mg L<sup>-1</sup> de aldicarb, carbofuran e carbaryl foram preparadas individualmente em acetonitrila (J.T. Baker, grau HPLC) e armazenadas em freezer. A partir de diluição das soluções estoque foi preparada uma solução padrão de trabalho contendo os três carbamatos na concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup>.

As soluções empregadas foram preparadas a partir de padrões de aldicarb (99,9% m/m – Sigma Aldrich), carbaryl (99,8% m/m – Sigma Aldrich), carbofuran (99,9% m/m – Sigma Aldrich), utilizando como solvente acetonitrila (J.T. Baker/ HPLC). Os solventes acetonitrila (J.T. Baker, grau HPLC), metanol (Mallinckrodt, grau HPLC), hexano (J.T. Baker, grau HPLC) e acetato de etila (Mallinckrodt, grau HPLC) foram empregados como extratores.

Para aplicação da técnica otimizada e validada foram utilizados os produtos comerciais dos carbamatos aldicarb (Temik<sup>®</sup> 150), carbofuran (Furadan<sup>®</sup> 100 G) e carbaryl (Sevin<sup>®</sup> 480 SC).

### 2.2.4 Preparo de amostras fortificadas

No processo de otimização e validação do método foram utilizadas amostras (isentas dos carbamatos) de suco de uva integral pasteurizado e bebida láctea achocolatada esterilizada, de marcas conhecidas, vendidas no comércio brasileiro. Essas bebidas foram fortificadas com solução padrão de

trabalho contendo os três agrotóxicos na concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup>. As amostras fortificadas foram deixadas em repouso por 3 horas.

### 2.2.5 Otimização da ELL-PBT

Foram otimizadas as seguintes variáveis para a técnica proposta: relação do volume de amostra e solvente extrator, adição de sal, composição da solvente extrator, procedimento de homogeneização, tempo de homogeneização e tempo de partição a frio. Essas variáveis são descritas na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Variáveis avaliadas no processo de otimização univariada da ELL-PBT de carbamatos em amostras de suco de uva e bebida láctea achocolatada

Variáveis	Níveis
Relação do volume de amostra (2,00 mL) e solvente extrator	1:1 1:2
Adição de sal	Sem adição de sal 1,5% de adição de sal
Solvente extrator (4,0 mL)	Acetonitrila, Metanol Hexano: Diclorometano (85:15) Acetonitrila:Acetato de Etila (81,25:18,75)

Homogeneização	Vortex (60 segundos)
	Ultrassom (10 minutos)
	Mesa agitadora (20 minutos)
Tempo de agitação (s)	30
	60
	90
Tempo de partição (h)	1
	3
	6

Amostras de bebida (2,00 mL) isentas de agrotóxicos, foram colocadas em frascos de vidro transparente (22 mL) e fortificadas com 40,0  $\mu\text{L}$  de solução-padrão contendo os agrotóxicos aldicarb, carbofuran e carbaryl a 5,0  $\text{mg L}^{-1}$  e homogeneizadas. Às amostras fortificadas (na presença e ausência de sal) foram acrescentadas as misturas extratoras (individualmente) em diferentes proporções (Tabela 2.1). Os sistemas foram devidamente homogeneizados e as amostras resfriadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por períodos previamente estabelecidos (Tabela 2.1). Após esse período, foi retirado 1,0 mL da fase orgânica. Esse extrato foi armazenado em frasco de vidro em freezer até o momento da análise cromatográfica. As condições de análise padronizadas foram baseadas na técnica otimizada e validada para piretróides em leite [9], modificando-se apenas o tempo de partição de 12 para 6 horas. Foi utilizada uma proporção 1:2 de amostra e solvente (acetonitrila); mesa agitadora por 20 minutos e 6 horas de partição. Quando uma variável era estudada, as outras eram mantidas constantes.

As variáveis do método otimizado foram selecionadas em função da eficiência da extração dos carbamatos nas duas bebidas de interesse. As porcentagens de recuperação foram calculadas pelas curvas analíticas construídas nos brancos das matrizes. A faixa de concentração das curvas analíticas dos agrotóxicos foi de 50,0 a 5000,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

### 2.2.6 Validação do método

Alguns parâmetros analíticos da ELL-PBT, incluindo seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade do método, precisão e exatidão, foram avaliados conforme sugerido pelos protocolos das principais agências regulatórias [19, 20, 21, 22].

No tratamento estatístico da Linearidade das curvas analíticas, foi realizado o ajuste exploratório dos dados de cada curva pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) [23, 24]. Os valores dispersos foram confirmados e tratados pelo teste dos resíduos padronizados Jackknife, o qual foi aplicado sucessivamente até que novos valores dispersos não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2 % no número original de resultados [25, 26]. Violações das premissas relacionadas à análise de regressão foram avaliadas: normalidade pelo teste de Ryan & Joiner [27], homoscedasticidade pelo teste de Levene modificado [28] e teste de Brown & Forsythe [29] e independência dos resíduos da regressão pelo teste de Durbin & Watson [30]. Testes de F foram conduzidos para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação das significâncias da regressão e do desvio da linearidade [31].

### 2.2.7 Aplicação da ELL-PBT

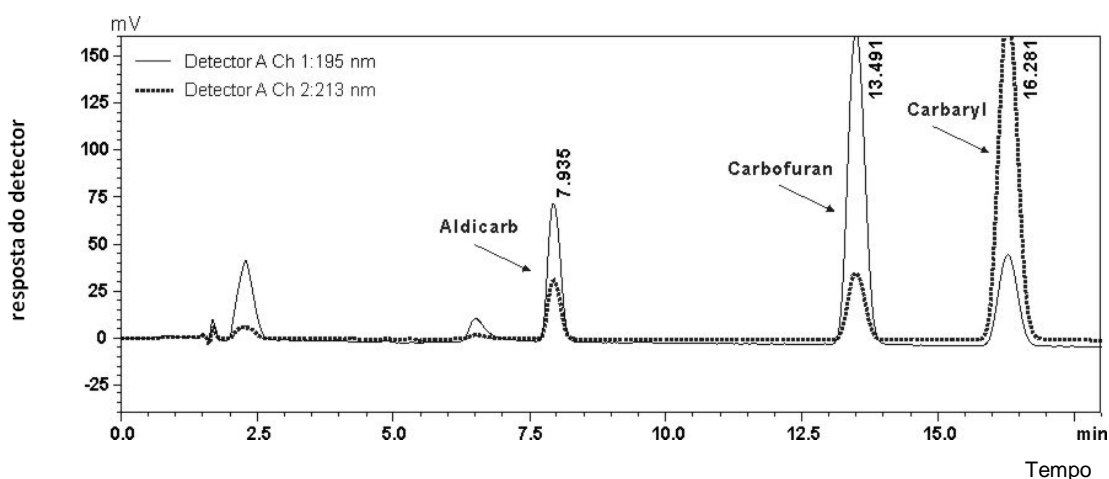
O método validado foi aplicado em quatro amostras de suco de uva e quatro amostras de bebida láctea achocolatada (de marcas diferentes) isentas dos agrotóxicos fortificadas ao acaso com os produtos comerciais dos carbamatos a fim de simular uma situação real de tentativa de envenenamento.

Um estudo paralelo foi realizado com quatro amostras de leite integral esterilizado adicionado de chocolate em pó a fim de se verificar diferenças entre a matriz bebida láctea achocolatada e leite integral adicionado de chocolate em pó.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Análise cromatográfica

As condições cromatográficas otimizadas para análise simultânea dos carbamatos permitiram uma boa separação dos princípios ativos conforme o cromatograma apresentado na Figura 2.1.



**Figura 2.1.** Cromatograma de uma solução padrão a  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  de aldicarb ( $t_R = 7,935 \text{ min}$ ), carbofuran ( $t_R = 13,491 \text{ min}$ ), e carbaryl ( $t_R = 16,281 \text{ min}$ ) em acetoneitrila.

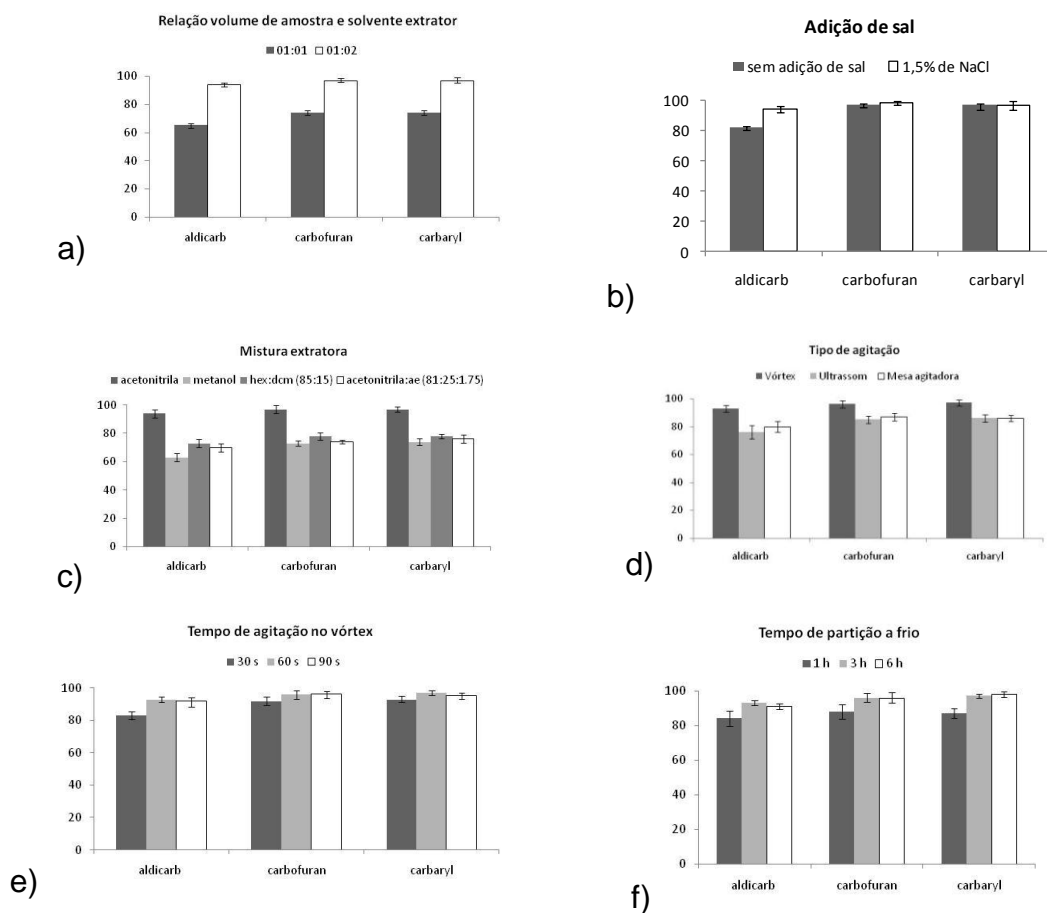
Os picos, com tempos de retenção ( $t_R$ ) iguais a 7,935; 13,491 e 16,281 min correspondem à aldicarb, carbofuran e carbaryl, respectivamente.

O detector ultravioleta foi selecionado para detecção simultânea dos carbamatos em dois comprimentos de onda ( $\lambda=195 \text{ nm}$  e  $213 \text{ nm}$ ). O comprimento de onda de absorção para aldicarb e carbofuran foi de  $195 \text{ nm}$  e para carbaryl de  $213 \text{ nm}$ . Nestas condições, os carbamatos foram analisados em 18 minutos.

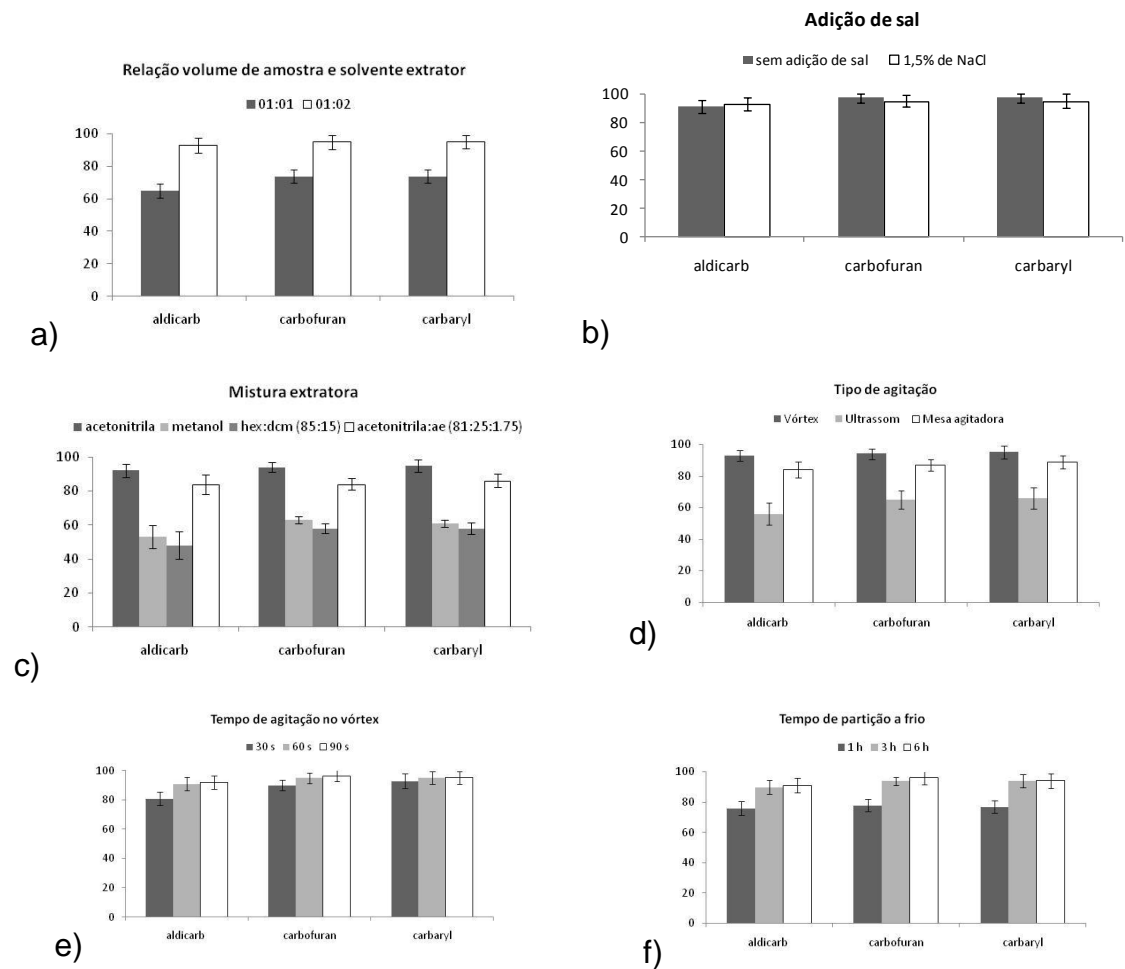
### 2.3.2 Otimização da ELL-PBT

Para aumentar a porcentagem de extração dos agrotóxicos para a fase orgânica, utilizando a técnica de ELL-PBT seis variáveis (relação do volume de amostra:solvente extrator, adição de sal, solvente extrator, homogeneização,

tempo de homogeneização e tempo de partição) foram otimizadas, como apresentado na Tabela 1 da parte experimental. As porcentagens de extração de cada um dos agrotóxicos para as duas bebidas estudadas (suco de uva e bebida láctea achocolatada) em cada uma das condições otimizadas estão representadas nas Figuras 2.2 e 2.3, respectivamente.



**Figura 2.2.** Porcentagens de extração obtidas na otimização da técnica de ELL-PBT de agrotóxicos em suco de uva: a) relação volume de amostra e solvente b) adição de sal, c) solvente extrator d) homogeneização e) tempo de agitação f) tempo de partição.



**Figura 2.3.** Porcentagens de extração obtidas na otimização da técnica de ELL-PBT de agrotóxicos em bebida láctea achocolatada: a) proporção entre volume de amostra e solvente b) adição de sal, c) solvente extrator d) homogeneização e) tempo de agitação f) tempo de partição.

### 2.3.2.1 Proporção entre volume de amostra e solvente extrator

Foram utilizadas inicialmente duas proporções entre o volume de bebida e o volume de acetonitrila (1:1 e 1:2 v/v). As bebidas foram fortificadas com os três agrotóxicos na concentração de  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Pode-se observar nas Figuras 2.2a e 2.3a que o aumento do volume de acetonitrila de 2,00 mL para 4,00 mL proporcionou um aumento de aproximadamente 21% na eficiência de extração dos agrotóxicos para os três carbamatos nas duas bebidas estudadas. Na técnica ELL-PBT, observou-se nesse trabalho e em trabalhos semelhantes [8,9] que uma proporção de volume de amostra e solvente extrator 1:2 (v/v)



facilita a migração dos solutos para a fase orgânica, independente da matriz e da classe de agrotóxicos estudada.

#### 2.3.2.2 Adição de sal

Com o objetivo de verificar o efeito da adição de sal na porcentagem de extração dos carbamatos no suco de uva e bebida láctea achocolatada, um estudo foi realizado avaliando-se a presença de 1,5% de NaCl nessas bebidas, como descrito na Tabela 2.1.

Com a adição de sal no suco de uva (Figura 2.2 b), a porcentagem de recuperação do aldicarb foi significativamente maior, não mostrando esta mesma tendência para os demais agrotóxicos. O aldicarb é o carbamato mais polar dentre os estudados nesse trabalho, além disso, apresenta um pKa de 2,93, distante do carbofuran e carbaryl, que apresentam respectivamente valores de pKa de 11,9 e 10,4, respectivamente. Essa diferença química reflete no comportamento desse agrotóxico em relação a outros da mesma classe química.

O aumento da força iônica da solução aquosa pela adição de NaCl provoca um efeito positivo na extração, devido à solvatação dos íons pelas moléculas de água, facilitando a migração dos agrotóxicos para a fase orgânica. Porém, em alguns trabalhos a adição de sal dificulta a formação de fase única, diminuindo a porcentagem de extração dos agrotóxicos [8].

Na bebida láctea achocolatada (Figura 2.3b), a adição de sal, não alterou significativamente a porcentagem de extração dos analitos.

Com base nesses resultados, na extração dos carbamatos em suco de uva, a etapa de adição de sal (NaCl) em 1,5% foi acrescentada. Na bebida láctea a etapa de adição de sal não é necessária.

#### 2.3.2.3 Solvente extrator

Nas duas bebidas estudadas a acetonitrila foi o solvente que proporcionou as maiores porcentagens de extração (superiores a 90%) para os três carbamatos (Figuras 2.2c e 2.3c). O solvente acetato de etila por apresentar um tempo de retenção próximo ao aldicarb, dificultou a quantificação desse carbamato. Ocorreu formação de emulsão nas duas

bebidas, quando foi adicionado diclorometano ao sistema, dificultando a separação das fases. O sistema continuou em fase única com a adição de metanol, mesmo após partição a frio, em virtude da alta solubilidade deste solvente em meio aquoso.

Na bebida láctea achocolatada, a adição de hexano induziu a precipitação da matriz, levando, conseqüentemente, à obtenção de porcentagens de extração inferiores a 60%. Além disso, a mistura hexano:diclorometano na proporção 85:15 formou um sistema bifásico com meio aquoso, tanto no suco de uva como na bebida láctea achocolatada.

#### 2.3.2.4 Processo de homogeneização

Foram avaliados três procedimentos de agitação e os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 2.2d e 2.3d. Pode-se observar que a agitação utilizando vortex levou à obtenção das maiores taxas de recuperação para os três agrotóxicos. Esses resultados foram significativamente, pelo teste t ao nível de 95% de confiança, superiores aos obtidos com o emprego da mesa agitadora e do banho ultrassônico. Menores porcentagens de extração e maiores desvios na análise foram obtidos quando se utilizou banho ultrassônico.

#### 2.3.2.5 Tempo de agitação

Três tempos de agitação em vortex foram estudados (30 s, 60 s e 90 s). A agitação por 30 s apresentou as menores taxas de recuperação nas duas bebidas (Figuras 2.2e e 2.3e), sendo que para o aldicarb essa diferença foi significativa em relação aos tempos 60 e 90 s, ao nível de 95% de confiança pelo teste t de Student, nas duas bebidas.

As agitações por 60 s e 90 s não apresentaram diferenças significativas nas duas bebidas estudadas. Assim, o tempo de 60 s foi escolhido para dar continuidade ao trabalho.

#### 2.3.2.6 Tempo de partição a frio

Nesse estudo procurou-se avaliar a eficiência de extração dos carbamatos durante a partição das fases pelo abaixamento da temperatura. A separação das fases pelo abaixamento da temperatura ocorre em virtude da diminuição da solubilidade dos solventes orgânicos em meio aquoso.

Observou-se que em um tempo de resfriamento menor que 3 horas a porcentagem de recuperação decresce para os três carbamatos (Figuras 2.2f e 2.3f). Acima de 3 horas não houve diferenças significativas ao nível de 95 % de probabilidade pelo teste t nas porcentagens de recuperação, embora a porcentagem de recuperação seja relativamente menor, possivelmente devido ao deslocamento de equilíbrio químico. Em função disso, foi adotado 3 horas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , como o tempo de partição do método.

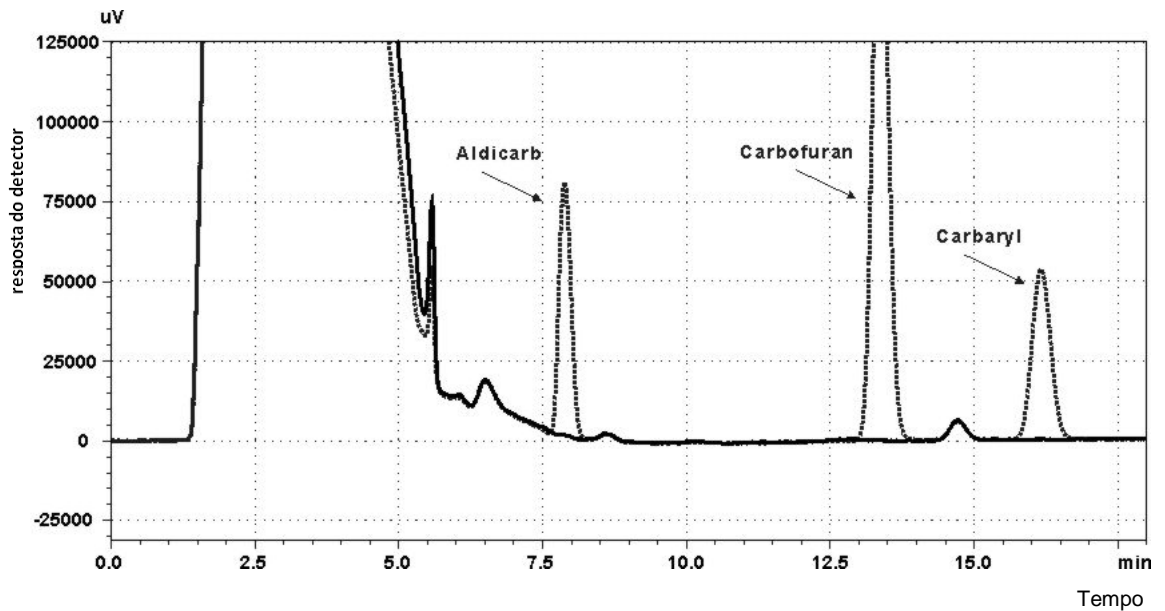
Um estudo paralelo congelando-se as fases aquosas, o que ocorre em um tempo superior a 6 horas no freezer, foi realizado a fim de se verificar a porcentagem de extração e presença de interferentes na matriz. Não houve diferenças significativas nas porcentagens de extração e os cromatogramas foram semelhantes aos extratos que permaneceram no freezer por 3 horas. Isso confirma que a distribuição do analito entre as fases aquosas e orgânicas ocorre predominantemente antes do congelamento da amostra, o que diminui o tempo de análise, aumentando a frequência analítica. Além disso, a ELL-PBT, utilizando-se 3 horas de partição em freezer, na análise de carbamatos em suco de uva e bebida láctea achocolatada, demonstrou ser uma técnica eficiente na purificação dos extratos, não sendo necessárias etapas posteriores de clean-up.

### 2.3.3 Validação do método otimizado

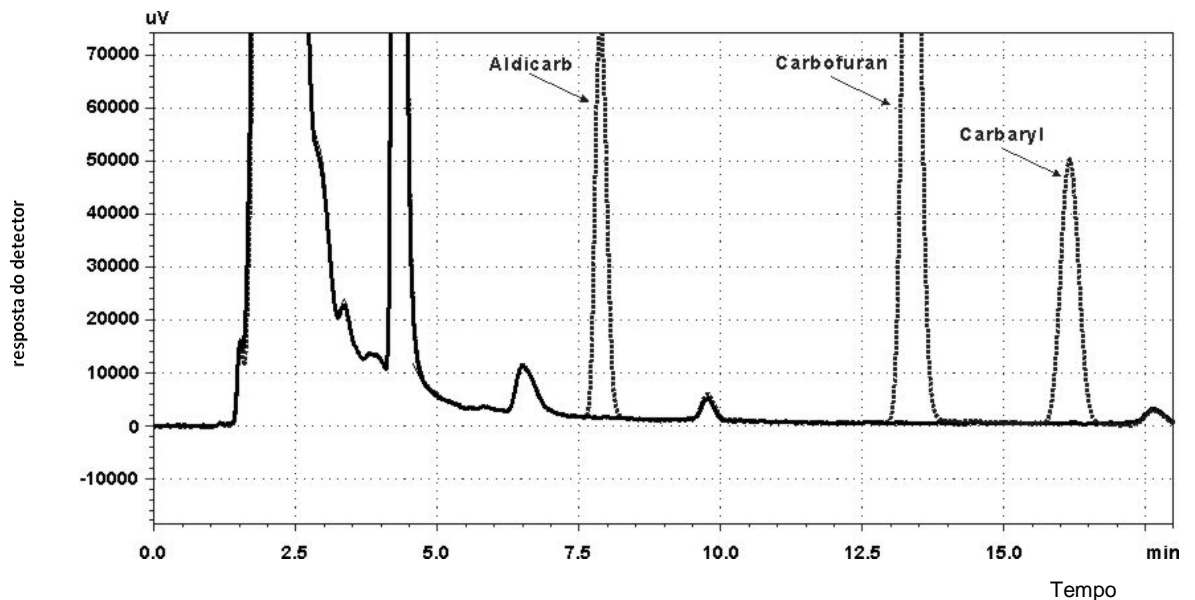
Após a otimização da ELL-PBT, o método proposto foi validado para o suco de uva e bebida láctea achocolatada. Para isso, 2,0 mL de bebida foram colocados em contato com 4,0 mL de acetonitrila. Para o suco de uva foi acrescentado 1,5% de NaCl (m/v) antes do contato com o solvente extrator. O sistema foi homogeneizado no vortex por 60 segundos. Após agitação, a amostra foi colocada em freezer por 3 horas para separação das fases. O extrato orgânico (1,0 mL) foi analisado por CLAE-UV.

#### 2.3.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi comprovada por comparação dos cromatogramas obtidos a 195 nm de amostras de suco de uva e bebida láctea achocolatada fortificadas, com os de amostras livres de carbamatos (Figuras 2.4 e 2.5).



**Figura 2.4:** Cromatograma de um extrato obtido de suco de uva isento dos princípios ativos (\_\_\_) e cromatograma de um extrato de suco de uva fortificado com  $2500,0 \mu\text{g L}^{-1}$  dos carbamatos (----).



**Figura 2.5:** Cromatograma de um extrato obtido de bebida láctea achocolatada isenta dos princípios ativos (\_\_\_) e cromatograma de um extrato de bebida láctea achocolatada fortificada com  $2500,0 \mu\text{g L}^{-1}$  dos carbamatos (----).

As amostras de suco de uva e bebida láctea achocolatada não apresentaram picos nos tempos de retenção dos carbamatos, além disso, os cromatogramas dos extratos apresentaram uma resolução cromatográfica satisfatória, mostrando a seletividade da técnica ELL-PBT para matrizes mais complexas.

### 2.3.3.2 Limite de detecção, limite de quantificação e linearidade

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método proposto foram determinados, respectivamente, como sendo o valor igual a 3 e 10 vezes o sinal da linha de base (ruído) obtido para amostras das bebidas (suco de uva e bebida láctea achocolatada) isentas de agrotóxicos (branco). Amostras fortificadas com carbamatos entre 1 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , foram submetidas à técnica de ELL-PBT e analisadas por CLAE-UV. Os limites de detecção para aldicarb, carbofuran e carbaryl foram respectivamente 15,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 12,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 8,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e os limite de quantificação foram, respectivamente, 50,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 40,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 25,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Tabela 2.2). Esses resultados foram semelhantes para as duas bebidas estudadas.

A linearidade do método foi avaliada analisando-se extratos obtidos a partir da ELL-PBT de amostras de suco de uva e bebida láctea achocolatada fortificadas com agrotóxicos para se obter no extrato final as seguintes concentrações: 50,0; 100,0; 500,0; 750,0; 1000,0; 2000,0; 3000,0; 5000,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sendo cada concentração em três replicatas. Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para as curvas analíticas dos três agrotóxicos nas duas bebidas estudadas foram superiores a 0,99 (Tabelas 2.2 e 2.3).

Tabela 2.2 Equações lineares do método ELL-PBT para suco de uva

Agrotóxicos	Dados da calibração	
	Equações	$R^2$
Aldicarb	$y = 222,33x + 1862,4$	0,9982
Carbofuran	$y = 717,92x - 37237$	0,9958
Carbaryl	$y = 801,12x + 8207,8$	0,9994

Tabela 2.3. Equações lineares do método ELL-PBT para bebida láctea achocolatada

Agrotóxicos	Dados da calibração	
	Equações	R <sup>2</sup>
Aldicarb	$y = 235,14x - 3093,1$	0,9997
Carbofuran	$y = 735,55x - 19310$	0,9999
Carbaryl	$y = 837,98x + 1754,1$	0,9999

A linearidade foi confirmada para todas as curvas preparadas nesse trabalho. Todos os valores dispersos identificados foram confirmados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, não sendo observadas tendências nos gráficos exploratórios dos resíduos das regressões, após o tratamento dos dados. A premissa de que os resíduos da regressão devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner [27]. Os coeficientes de determinação obtidos foram superiores a 0,99. Estes resultados indicaram que o desvio da normalidade não foi significativo ( $p > 0,10$ ), permitindo o uso dos testes de hipóteses de t e F. A variabilidade dos resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração estudados foi constante, demonstrando homoscedasticidade. A estatística t de Levene não foi significativa ( $p > 0,05$ ) em todas as curvas examinadas. Independência dos resíduos da regressão foi evidenciada pelo teste de Durbin-Watson [30], uma vez que as distribuições dos pontos não apresentaram tendências positivas ou negativas. Assim, o uso do MMQO foi adequado para estimativa dos parâmetros das regressões. Estudos empregando testes estatísticos para validação de métodos de análise em alimentos têm sido utilizados para dar maior credibilidade aos resultados [32].

### 2.3.3.3 Exatidão e precisão do método

Para determinar a exatidão do método, amostras de bebidas em triplicata (isentas de agrotóxicos) foram fortificadas com  $100,0 \mu\text{gL}^{-1}$ ;  $200,0 \mu\text{gL}^{-1}$ ;  $1000,0 \mu\text{gL}^{-1}$  dos agrotóxicos. A taxa de recuperação obtida para o método proposto variou de 93 a 97%, com coeficientes de variação inferiores a 5%. A precisão do método foi determinada em termos do coeficiente de variação (CV) para nove extrações idênticas de amostra de bebidas fortificadas

com 500,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e análise por CLAE-UV. Os resultados obtidos para suco de uva e bebida láctea achocolatada estão apresentados nas Tabelas 2.4 e 2.5, respectivamente.

Tabela 2.4. Porcentagens de recuperação dos três agrotóxicos, após extração da amostra de suco de uva fortificada com quatro concentrações diferentes

Concentração	Recuperação média e CV (%)					
	Aldicarb		Carbofuran		Carbaryl	
Suco de uva ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )						
100,0 <sup>a</sup>	94,3	2,3	96,6	2,2	96,2	1,2
200,0 <sup>a</sup>	91,4	2,5	96,4	1,5	97,1	2,5
500,0 <sup>b</sup>	93,4	2,0	97,0	2,9	96,8	1,5
1000,0 <sup>a</sup>	94,2	2,2	96,9	3,2	96,9	1,5

<sup>a</sup>Resultados representam uma média de três repetições.

<sup>b</sup>Resultados representam uma média de nove repetições.

Tabela 2.5. Porcentagens de recuperação dos três agrotóxicos, após extração da amostra de bebida láctea achocolatada em quatro concentrações diferentes

Concentração	Recuperação média e CV (%)					
	Aldicarb		Carbofuran		Carbaryl	
Bebida láctea ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )						
100,0 <sup>a</sup>	93,6	4,1	95,6	4,2	96,6	4,2
200,0 <sup>a</sup>	93,4	4,5	95,9	4,5	96,4	3,5
500,0 <sup>b</sup>	92,8	4,9	96,8	4,0	97,6	3,8
1000,0 <sup>a</sup>	93,7	4,2	95,9	3,7	95,9	3,6

<sup>a</sup>Resultados representam uma média de três repetições.

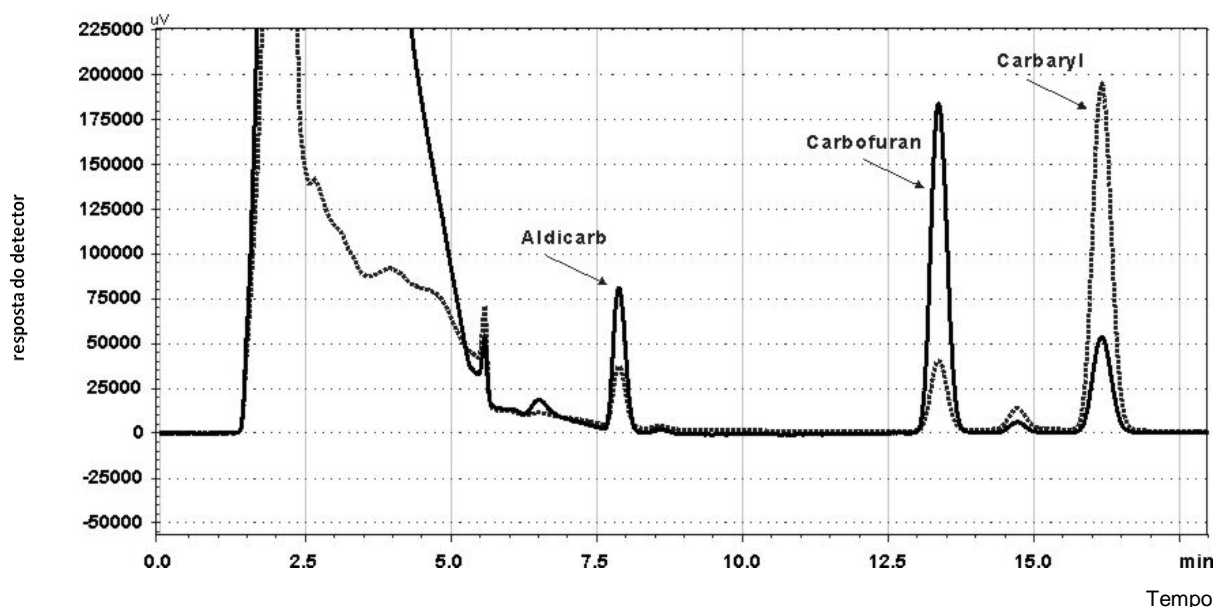
<sup>b</sup>Resultados representam uma média de nove repetições.

Os resultados apresentados nas Tabelas 4 e 5 não diferem entre si, em nível de 95% de probabilidade pelo teste t de Student, mostrando que a porcentagem de recuperação independe do nível de concentração dos analitos nas amostras.

#### 2.3.3.4 Aplicação do método

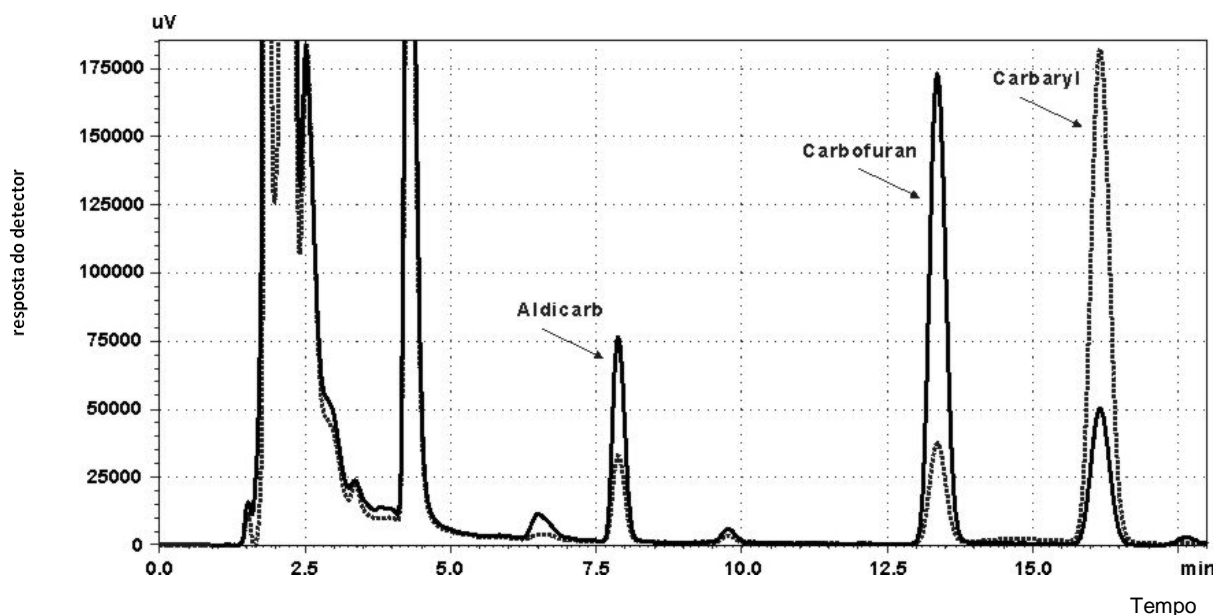
O método validado foi aplicado em quatro amostras (isentas dos agrotóxicos) de suco de uva e de bebida láctea achocolatada, fortificadas ao acaso com os produtos comerciais dos carbamatos. Esse procedimento foi realizado com o objetivo de simular uma situação real de tentativa de envenenamento e verificar se os componentes dos produtos comerciais interfeririam na seletividade da análise. Um estudo foi realizado com quatro amostras de leite integral esterilizado adicionado de chocolate em pó a fim de se verificar se os resultados dessa matriz seriam diferentes dos obtidos para bebida láctea achocolatada.

Em todas as amostras de bebidas extraídas pelo método ELL-PBT não houve interferências dos componentes dos produtos comerciais como pode ser observado pelos cromatogramas das Figuras 2.6 e 2.7 (suco de uva e bebida láctea achocolatada respectivamente). Além disso, não há diferença entre os resultados obtidos para extratos de bebida láctea achocolatada e leite integral adicionado de chocolate em pó, o que confirma a robustez do método proposto.



**Figura 2.6:** Cromatograma de um extrato obtido de suco de uva adicionado dos produtos comerciais dos carbamatos analisados a 195 nm (\_\_\_) e 213 nm (----).





**Figura 2.7:** Cromatograma de um extrato obtido de bebida láctea achocolatada adicionada dos produtos comerciais dos carbamatos analisados a 195 nm (—) e 213 nm (----).

## 2.4 CONCLUSÃO

A otimização da ELL-PBT, para extração de carbamatos em suco de uva e bebida láctea achocolatada por CLAE-UV, resultou em um método rápido, eficaz, seletivo e de baixo custo, uma vez que o consumo de solvente orgânico utilizado foi mínimo (4,00 mL). Além disso, o método proposto apresentou porcentagens de recuperação elevadas para os três carbamatos (superiores a 90%) nas duas matrizes estudadas. O método de extração e análise foi validado com resultados satisfatórios, podendo ser recomendado para aplicação em análises forenses.

## 2.5 REFERÊNCIAS

- [1] J. Grendon, F. Frost, L. Baum, *Vet. Human Toxicol.* 36 (1994) 218–223.
- [2] M. Passagli, *Toxicologia Forense- Teoria e prática*, 2 ed. Millenium, Campinas, 2009.
- [3] P. Proenca, H. Teixeira, M. C. Mendonca, F. Castanheira, E. P. Marques, F. Corte-Real, D. N. Vieira, *For. Sci. Int.* 146 (2004) 79–81.

- [4] US Environmental Protection Agency, National Survey of Pesticides in Drinking Water Wells, Phase II Report, EPA 570/9-91-020, 1992.
- [5] E. Lacassie, P. Marquet, J. M, Gaulier, M. F. Dreyfuss, G. Lachatre, For. Sci. Int.121 (2001) 116-125.
- [6] WHO. Environmental Health Criteria. Who Technical Report Series, N. 53, (1989). <[http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest53\\_e.htm](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest53_e.htm)>
- [7] R. K. Jhuhler, *J. Chromatogr. A* 786 (1997)145-153.
- [8] H. P. Vieira, A. A. Neves, M. E. L. R. Queiroz, *Quim. Nova* 30 (2007) 535-540.
- [9] S. M. Goulart, M. E. L. R. Queiroz, A. A. Neves, J. H. Queiroz, *Talanta* 75/5 (2008) 1320-1323.
- [10] F. A. Tarbah, H. Mahler, O. Temme, T. Daldrup, *For. Sci. Int.*121 (2001) 126-133.
- [11] C. Basheer, A. A. Alnedhary, B. S. M. Rao, R. Balasubramanian, H. K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 211–216.
- [12] K. Granby, J.H. Andersen, H.B. Christensen, *Anal. Chim. Acta* 520 (2004) 165-176.
- [13] K. Ameno, S. Lee, S. In, J. Yang, Y. Yoo, S. Ameno, T. Kubota, H. Kinoshita, I. Ijiri, *For. Sci. Int.* 116 (2001) 59-61.
- [14] T. Párron, A. F. Hernández, E. Villanueva, *For. Sci. Int.* 79 (1996) 53-63.
- [15] H. Teixeira, P. Proenca, M. Alvarenga, M. Oliveira, E. P. Marques, D. N. Vieira, *For. Sci. Int.* 143 (2004) 199–204.
- [16] Q. Liu, L. Zhou, N. Zheng, L.Zhuo, Y. Liu, L. Liu, *For. Sci. Int.* 193 (2009) 88–94.
- [17] Y. Wang, P. Kruzik, A. Helsberg, I. Helsberg, W. Rausch, *For. Sci. Int.*169 (2007) 157–160.
- [18] R. Akcan, A. Hilal, N. Daglioglu, N. Cekin, M. K. Gulmen, *For. Sci. Int.*189 (2009) 82–87.
- [19] ANVISA, Portaria No. 1.469/2000 of 29 December. National Health Agency, Brazil.
- [20] INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

- [21] ICH (International Conference on Harmonisation). Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95) 1995.
- [22] M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood, *Pure & Appl. Chem.* 74 (2002) 835-855.
- [23] P. C. Meyer, R. E. Zund, *Statistical methods in analytical chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 1993. p. 81-134.
- [24] S. V.C. Souza, R. G. Junqueira, *Anal. Chim. Acta* 552 (2005) 25–35.
- [25] D. A. Belsley, E. Kuh,; R. E. Welsch, *Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity*. New York: Wiley, 1980.
- [26] W. Horwitz, *Pure Appl. Chem.* 67, (1995) 331-343.
- [27] T. A. Ryan, B. L. Joiner, *Normal probability plots and tests for normality*. The State College: Pennsylvania State University, 1976.
- [28] H. Levene, Robust tests for equality of variances. In: Olkin, I.; Ghurye, S.G.; Hoeffding, W.; Madow, W.G.; Mann, H.B. (Ed.) *Contributions to probability and statistics*. Stanford: Stanford University Press, 1960.
- [29] M. B. Brown, A. B. Forsythe, *J. Am. Stat. Assoc.* 69, (1974). 364-367.
- [30] J. Durbin, G. S. Watson, *Biometrika* 38 (1951) 159-178.
- [31] N. Draper, H. Smith, *Applied regression analysis*. New York: Wiley. 1998.
- [32] S. V. C. Souza, J. A. Lima, J. C. Teodoro, R. G. Junqueira, *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 27(2007) 823-836.

## **CAPÍTULO 3**

### **OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA PARA DETERMINAÇÃO DE CARBAMATOS EM BOLO E BRIGADEIRO**

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

Os carbamatos representam a principal classe de inseticidas envolvidos nos casos de intoxicação humana e animal [1]. Alguns compostos deste grupo, com seus respectivos nomes comerciais são: carbaryl (Sevin®), aldicarb (Temik®), carbofuran (Furadan®). Alimentos contaminados com essas substâncias são frequentemente envolvidos na ingestão acidental, suicídio e homicídios no Brasil [2].

Os alimentos e bebidas de coloração escura, como bolos, cafés e achocolatados, são frequentemente empregados como veículos de envenenamento devido à coloração acinzentada dos produtos comerciais desses agrotóxicos. Nos últimos 2 anos, 157 casos de intoxicação por ingestão de alimentos (carnes, café, leite, sopa, suco, biscoitos e chocolate) contaminados com aldicarb foram relatados no Estado do Rio de Janeiro [2]. Esses dados refletem os potenciais efeitos tóxicos destas substâncias e a necessidade de maior fiscalização, controle e conscientização da população.

Várias técnicas [3-6] estão disponíveis para a detecção de carbamatos em alimentos. As análises geralmente envolvem muitas etapas, consumindo muito tempo e necessitando de procedimentos de derivatização [7] que não são aplicáveis em casos de emergência relacionados às intoxicações graves [8].

A extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) e a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) têm sido utilizadas para determinação de agrotóxicos em várias matrizes como água [9,10], leite [11], manteiga [12], tomates [13] e mel [14]. Ela apresenta vantagens em relação às demais técnicas de extração, como praticidade, número de etapas reduzido, baixo consumo de solventes orgânicos, além de ser confiável e seletiva.

O objetivo deste trabalho foi otimizar e validar a técnica ESL-PBT para determinação dos carbamatos aldicarb, carbofuran e carbaryl em bolo e brigadeiro por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV).

## **3.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.2.1 Equipamentos**

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido Shimadzu LC 20AT equipado com um detector UV/VIS Shimadzu SPD 20A, forno da coluna, Shimadzu CTO 10ASVP, injetor automático Shimadzu SIL 10AF; sistema de integração Lab Solutions da Shimadzu; Banho ultra-sônico Maxi Clean 750- Unique (saída de 150 W e frequência de 33 kHz); mesa agitadora (Tecnal TE – 420, São Paulo, Brasil) a 25 °C e 175 oscilações por minuto; e vortex (Certomat® MV).

### **3.2.2 Condições cromatográficas**

As seguintes condições cromatográficas foram ajustadas para determinação simultânea de aldicarb, carbofuran e carbaryl por CLAE

(cromatografia líquida de alta eficiência): Coluna Phenomenex Luna 3um C18, 100 A 150 x 4,6 mm; fase móvel: água purificada: acetonitrila 65:35 v:v, vazão da fase móvel: 0,8 mL min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna: 35 °C e volume de injeção 20 µL. Detector de UV (λ: 195 nm-aldicarb e carbofuran e 213 nm - carbaryl).

### 3.2.3 Reagentes e soluções

As soluções padrão estoque na concentração de 1000,0 mg L<sup>-1</sup> de aldicarb, carbofuran e carbaryl foram preparadas individualmente em acetonitrila (J.T. Baker, grau HPLC) e armazenadas em freezer. A partir de diluição das soluções estoque foi preparada uma solução padrão de trabalho contendo os três carbamatos na concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup>.

As soluções empregadas foram preparadas a partir de padrões de aldicarb (99,9% m/m – Sigma Aldrich), carbaryl (99,8% m/m – Sigma Aldrich), carbofuran (99,9% m/m – Sigma Aldrich), utilizando como solvente acetonitrila (J.T. Baker/ HPLC). Os solventes acetonitrila (J.T. Baker, grau HPLC), metanol (Mallinckrodt, grau HPLC), hexano (J.T. Baker, grau HPLC) e acetato de etila (Mallinckrodt, grau HPLC) foram empregados como extratores.

Para aplicação da técnica otimizada e validada foram utilizados os produtos comerciais dos carbamatos aldicarb (Temik<sup>®</sup> 150), carbofuran (Furadan<sup>®</sup> 100 G) e carbaryl (Sevin<sup>®</sup> 480 SC).

### 3.2.4 Preparo de amostras fortificadas

No processo de otimização e validação do método foram utilizadas amostras (isentas dos carbamatos) de bolo e brigadeiro vendidas no comércio Viçosa-MG. As amostras foram fortificadas com solução padrão de trabalho contendo os três agrotóxicos na concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup>. As amostras fortificadas foram deixadas em repouso por 3 horas.

### 3.2.5 Otimização da ESL-PBT

Foram otimizadas as seguintes variáveis para a técnica proposta: , adição de água, relação do volume de água e solvente extrator, adição de sal,

composição da solvente extrator, procedimento de homogeneização, tempo de homogeneização e tempo de partição a frio. Essas variáveis são descritas na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Variáveis avaliadas no processo de otimização univariada da ESL-PBT de carbamatos em amostras de bolo e brigadeiro

Variáveis	Níveis
Adição de água (mL)	0 1 2
Relação do volume de água (2 mL) e solvente extrator	1:1 1:2
Adição de sal	Sem adição de sal 1,5% m/m de NaCl (1,0000 g de amostra) 1,5% m/v de NaCl (2 mL de água adicionada)
Solvente extrator (4,0 mL)	Acetonitrila, Metanol Hexano: Diclorometano (85:15) Acetonitrila:Acetato de Etila (81,25:18,75)
Homogeneização	Vortex (60 segundos) Ultrassom (10 minutos) Mesa agitadora (10 minutos)
Tempo de agitação em mesa agitadora (minutos)	5 10 20
Tempo de partição (h)	1 3 6

Amostras de bolo e brigadeiro (1,0000 g) isentas de agrotóxicos, foram colocadas em frascos de vidro transparente (22 mL) e fortificadas com 40,0  $\mu\text{L}$  de solução-padrão contendo os agrotóxicos aldicarb, carbofuran e carbaryl a 5,0 mg  $\text{L}^{-1}$  e homogeneizadas. Às amostras fortificadas (na presença e ausência de adição de sal) foram acrescentadas água e solvente extrator em diferentes proporções (Tabela 3.1). O sistema foi devidamente homogeneizado e as amostras resfriadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por períodos previamente estabelecidos (Tabela 3.1). Após esse período, foi retirado 1 mL da fase orgânica. Esse extrato foi armazenado em frasco de vidro em freezer até o momento da análise cromatográfica. As condições de análise padronizadas foram baseadas na técnica otimizada e validada para piretróides em leite [11], modificando-se apenas o tempo de partição de 12 para 6 horas. Foi utilizada uma proporção 1:2 de amostra e solvente (acetonitrila); mesa agitadora por 20 minutos e 6 horas de partição. Quando uma variável era estudada, as outras eram mantidas constantes.

As variáveis do método otimizado foram selecionadas em função da eficiência da extração dos carbamatos nas duas matrizes de interesse. As porcentagens de recuperação foram calculadas pela curva analítica construída no branco da matriz. A faixa de concentração da curva foi de 50,0 a 5000,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

### 3.2.6 Validação do método

Os parâmetros analíticos da ESL-PBT, incluindo seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade do método, precisão e exatidão, foram avaliados conforme sugerido pelos protocolos das principais agências regulatórias [15-18].

No tratamento estatístico da Linearidade das curvas analíticas, foi realizado o ajuste exploratório dos dados de cada curva pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) [19, 20]. Os valores dispersos foram confirmados e tratados pelo teste dos resíduos padronizados Jackknife, o qual foi aplicado sucessivamente até que novos valores dispersos não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2 % no número original de resultados [21, 22]. Violações das premissas relacionadas à análise de regressão foram avaliadas: normalidade pelo teste de Ryan & Joiner [23],



homoscedasticidade pelo teste de Levene modificado [24] e teste de Brown & Forsythe [25] e independência dos resíduos da regressão pelo teste de Durbin & Watson [26]. Testes de F foram conduzidos para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação das significâncias da regressão e do desvio da linearidade [27].

### 3.2.7 Aplicação da ESL-PBT

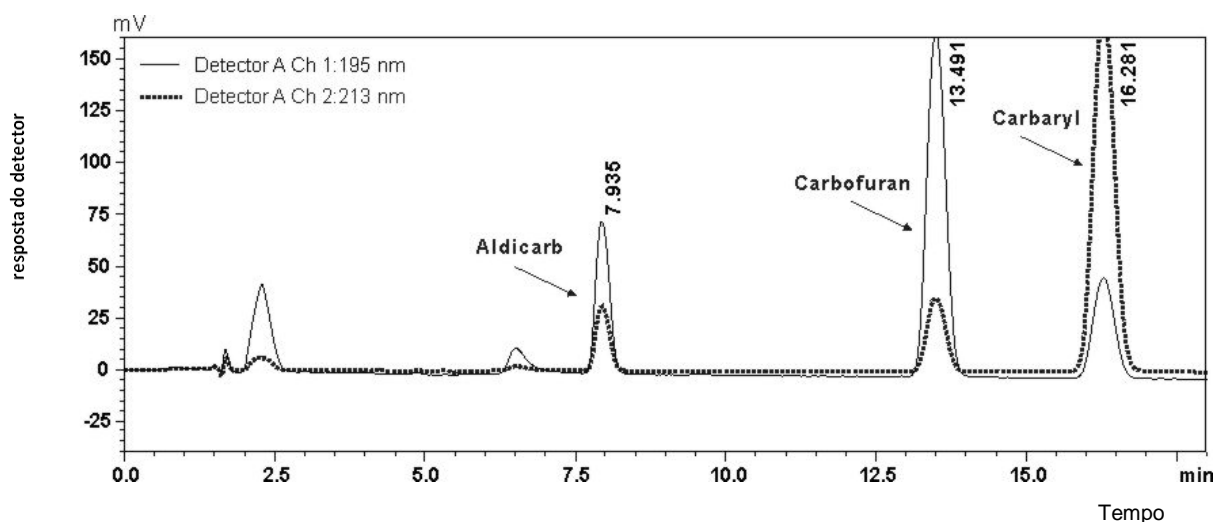
O método validado foi aplicado em quatro amostras de bolo e quatro amostras de brigadeiro de diferentes procedências, isentas dos agrotóxicos fortificadas ao acaso, em triplicata, com os produtos comerciais dos carbamatos a fim de simular uma situação real de tentativa de envenenamento.

Um estudo paralelo foi realizado com três amostras de diferentes bolos (com chocolate granulado- tipo prestígio, com chocolate em pó e sem chocolate) a fim de se verificar diferenças entre a extração de bolos com características distintas. Diferentes tipos de bombons (com recheio de coco, recheio de brigadeiro e recheio de nozes) também foram avaliados.

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 Análise cromatográfica

As condições cromatográficas otimizadas para análise simultânea dos carbamatos permitiram uma boa separação dos princípios ativos conforme o cromatograma apresentado na Figura 3.1.



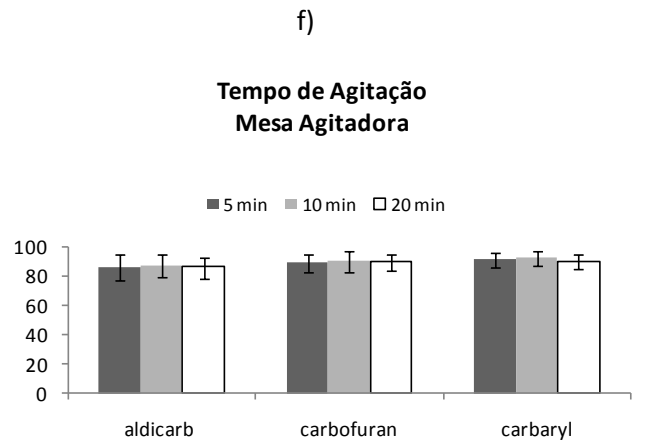
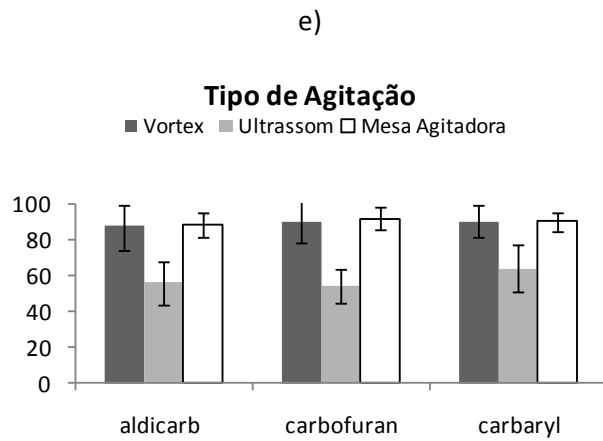
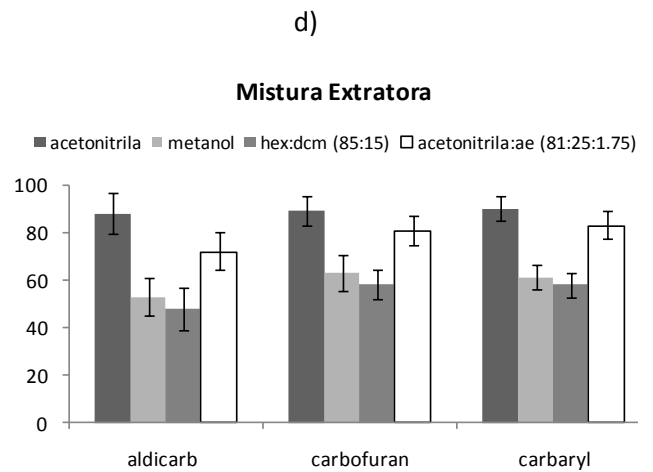
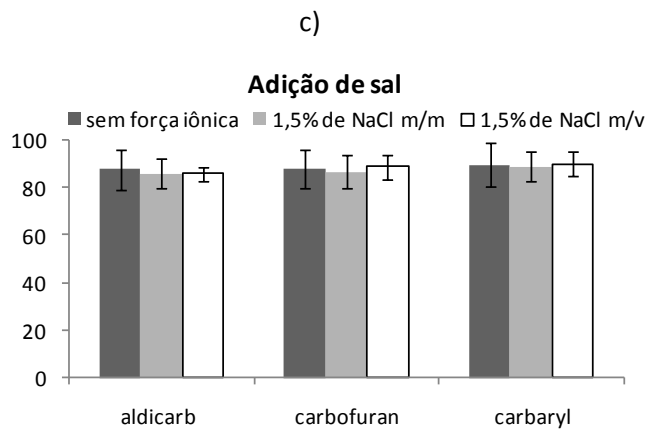
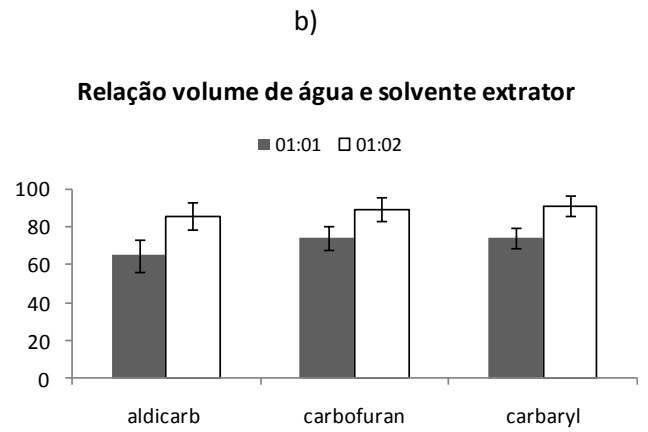
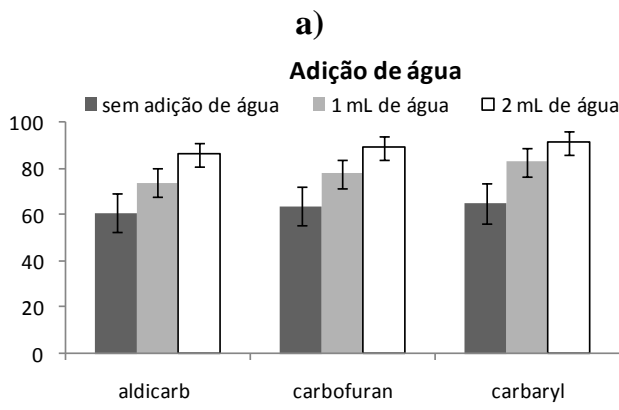
**Figura 3.1.** Cromatograma de uma solução padrão a  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  de aldicarb ( $t_R = 7,935 \text{ min}$ ), carbofuran ( $t_R = 13,491 \text{ min}$ ), e carbaryl ( $t_R = 16,281 \text{ min}$ ) em acetonitrila.

Os picos, com tempos de retenção ( $t_R$ ) iguais a 7,935; 13,491 e 16,281 min correspondem à aldicarb, carbofuran e carbaryl, respectivamente.

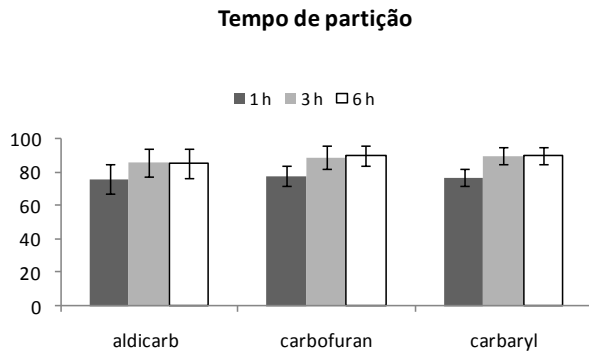
O detector ultravioleta foi selecionado para detecção simultânea dos carbamatos em dois comprimentos de onda ( $\lambda=195 \text{ nm}$  e  $213 \text{ nm}$ ). O comprimento de onda de absorção para aldicarb e carbofuran foi de  $195 \text{ nm}$  e para carbaryl de  $213 \text{ nm}$ . Nestas condições, os carbamatos foram analisados em 18 minutos.

### 3.3.2 Otimização da ESL-PBT

Para aumentar a porcentagem de extração dos agrotóxicos pela fase orgânica, utilizando a técnica de ESL-PBT sete variáveis (adição de água, relação do volume de água ( $2,00 \text{ mL}$ ) e solvente extrator, adição de sal, solvente extrator, homogeneização, tempo de homogeneização em mesa agitadora e tempo de partição) foram otimizadas, como apresentado na Tabela 3.1 da parte experimental. As porcentagens de extração de cada um dos agrotóxicos para os dois alimentos estudados (bolo e brigadeiro) em cada uma das condições otimizadas estão representadas nas Figuras 3.2 e 3.3, respectivamente.

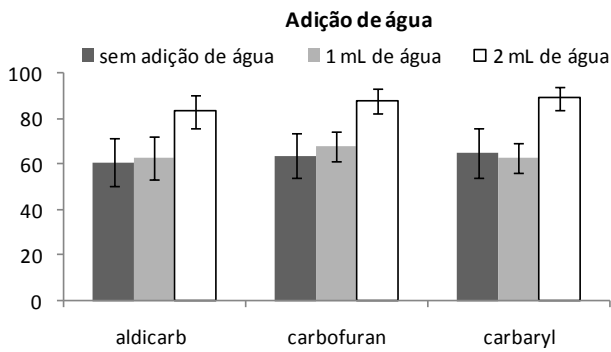


g)

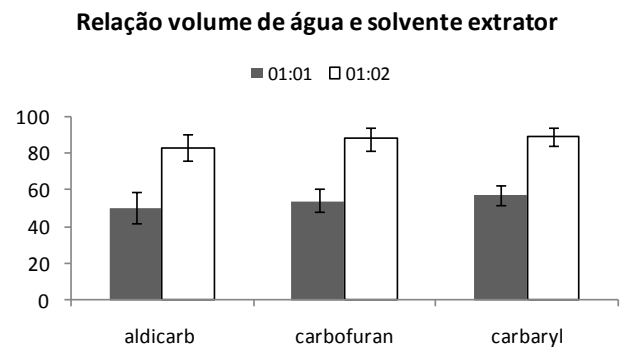


**Figura 3.2.** Porcentagens de extração obtidas na otimização da técnica de ESL-PBT de agrotóxicos em bolo: a) Adição de água b) relação volume de água e solvente c) adição de sal, d) solvente extrator e) homogeneização f) tempo de agitação g) tempo de partição.

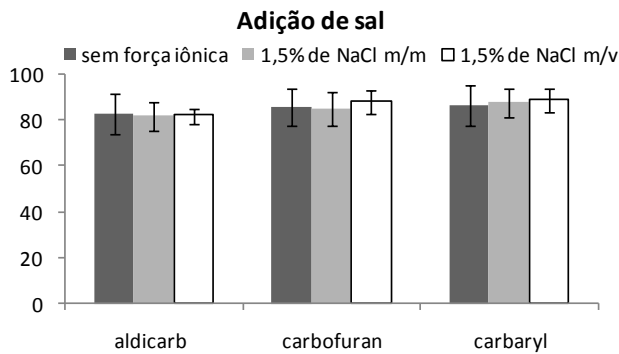
a)



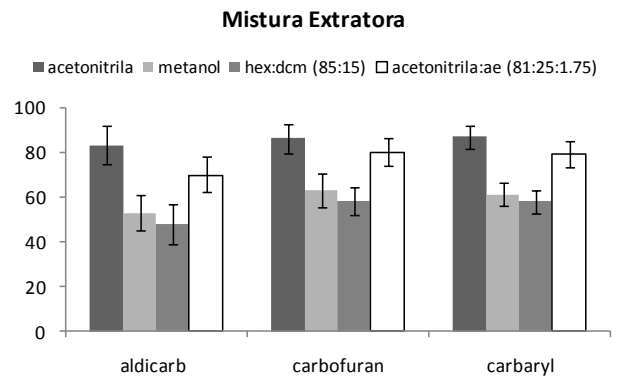
b)



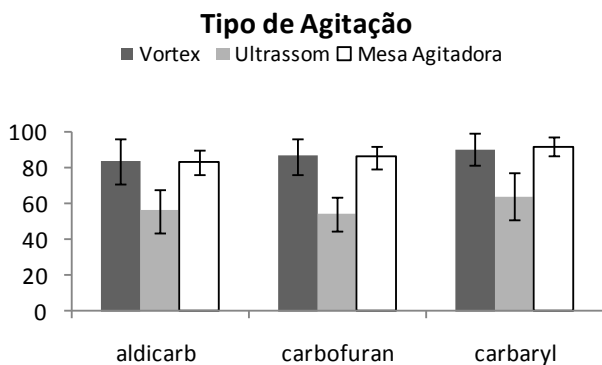
c)



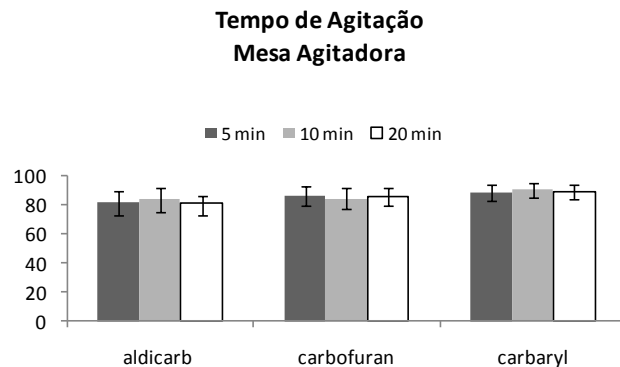
d)



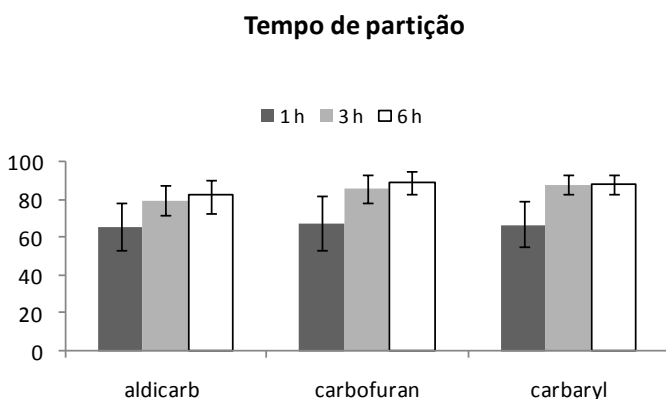
e)



f)



g)



**Figura 3.3.** Porcentagens de extração obtidas na otimização da técnica de ESL-PBT de agrotóxicos em brigadeiro: a) Adição de água b) proporção entre volume de amostra e solvente c) adição de sal, d) solvente extrator e) homogeneização f) tempo de agitação g) tempo de partição.

### 3.3.2.1 Adição de água às amostras sólidas (bolo e brigadeiro)

Com o objetivo de verificar o efeito da adição de água na porcentagem de extração dos carbamatos em bolo e brigadeiro, um estudo foi realizado avaliando-se a ausência de água, a adição de 1,00 mL de água e de 2,00 mL de água antes do procedimento de extração com o solvente orgânico. As amostras de bolo e brigadeiro foram fortificadas com os três agrotóxicos na concentração de  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  e submetidas aos tratamentos citados

anteriormente. Pode-se observar nas Figuras 3.2a e 3.3a que a adição de 2 mL de água proporcionou porcentagens de extração dos agrotóxicos acima de 80% para os três carbamatos nas duas matrizes. Com ausência de água, a extração foi aproximadamente 60% para todos os agrotóxicos. Observa-se pelos resultados que na técnica ESL-PBT existe a necessidade de adição de água em matrizes sólidas o que facilita a migração dos solutos para a fase orgânica, principalmente porque os carbamatos são agrotóxicos polares.

#### 3.3.2.2 Proporção entre volume de água e solvente extrator

Foram utilizadas inicialmente duas proporções entre o volume de água (2 mL) e o volume de acetonitrila (1:1 e 1:2 v/v ). As amostras de bolo e brigadeiro foram fortificadas com os três agrotóxicos na concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup>. Pode-se observar nas Figuras 3.2b e 3.3b que o aumento do volume de acetonitrila de 2,00 mL para 4,00 mL proporcionou um aumento de aproximadamente 18% e 30% na eficiência de extração dos agrotóxicos para os três carbamatos em bolo e brigadeiro, respectivamente. Observa-se nesse trabalho e em trabalhos semelhantes [9, 11] que uma proporção de água e solvente extrator aproximadamente 1:2 (v/v) facilita a migração dos solutos para a fase orgânica, independente da matriz e da classe de agrotóxicos estudada.

#### 3.3.2.3 Adição de sal

Com o objetivo de verificar o efeito da adição de sal na porcentagem de extração dos carbamatos em bolo e brigadeiro, um estudo foi realizado avaliando-se a presença de 1,5% m/m e 1,5% m/v de NaCl nessas matrizes, considerando respectivamente 1,0000 g e 2,00 mL de água adicionada, como descrito na Tabela 3.1.

Com a adição de sal na extração de carbamatos em bolo e brigadeiro (Figura 3.2c e 3.3c), as porcentagens de recuperação dos três carbamatos não foram significativamente maiores. Resultados semelhantes foram obtidos na extração de piretróides em mel [14].

#### 3.3.2.4 Solvente extrator

Nas duas matrizes estudadas a acetonitrila foi o solvente que proporcionou as maiores porcentagens de extração (superiores a 83%) para os três carbamatos (Figuras 3.2d e 3.3d). A acetonitrila tem se mostrado o solvente mais adequado na extração de carbamatos em água [10] e piretróides em leite [11]. A mistura acetonitrila e acetato de etila foi eficiente para extração de piretróides em água [9]. O acetato de etila apresenta tempo de retenção próximo ao aldicarb, o que dificulta sua utilização na análise de carbamatos. Os demais solventes testados (hexano, diclorometano e metanol) dificultaram a formação de fase única e após a partição a baixa temperatura, não favoreceram a separação das fases, além disso, os extratos orgânicos apresentaram muitos componentes da matriz.

#### 3.3.2.5 Processo de homogeneização

Foram avaliados três procedimentos de agitação e os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 3.2e e 3.3e. Pode-se observar que as porcentagens de extração dos carbamatos quando se utilizou a agitação em mesa agitadora por 10 minutos e vórtex por 60 segundos foram semelhantes e levaram à obtenção das maiores taxas de recuperação para os três agrotóxicos nas duas matrizes. Os piores resultados foram obtidos quando se utilizou banho ultrassônico, uma vez que este não promoveu um contato efetivo, obtendo conseqüentemente menores porcentagens de extração e maiores desvios na análise. A mesa agitadora foi o tipo de agitação escolhido em função dos menores desvios padrão e também em função da precisão dos resultados.

#### 3.3.2.6 Tempo de agitação

Três tempos de agitação em mesa agitadora foram estudados (5, 10 e 20 minutos). Observa-se nas Figuras 3.2f e 3.3f que não há diferença entre os três tratamentos. Ao nível de 95% de confiança pelo teste t de Student, nas duas matrizes, para os três compostos, a diferença não é significativa.

Assim, o tempo de 5 minutos foi escolhido para dar continuidade ao trabalho.

### 3.3.2.7 Tempo de partição a frio

Nesse estudo procurou-se avaliar a eficiência de extração dos carbamatos durante a partição das fases pelo abaixamento da temperatura. A separação das fases pelo abaixamento da temperatura ocorre em virtude da diminuição da solubilidade dos solventes orgânicos em meio aquoso.

Observou-se que em um tempo de resfriamento de 1 hora a porcentagem de recuperação é menor para os três carbamatos (Figuras 3.2g e 3.3g). Comparando-se 3 horas e 6 horas de partição não houve diferenças significativas ao nível de 95 % de probabilidade pelo teste t nas porcentagens de recuperação. Em função disso, foi adotado 3 horas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , como o tempo de partição do método.

Um estudo paralelo congelando-se o sistema, o que ocorre em um tempo superior a 6 horas no freezer, foi realizado a fim de se verificar a porcentagem de extração e presença de interferentes na matriz. Não houve diferenças significativas nas porcentagens de extração e os cromatogramas foram semelhantes aos extratos que permaneceram no freezer por 3 horas. Isso confirma que a distribuição do analito entre as fases aquosas e orgânicas ocorre predominantemente antes do congelamento da amostra, o que diminui o tempo de análise, aumentando a frequência analítica. Além disso, a ESL-PBT, utilizando-se 3 horas de partição em freezer, na análise de carbamatos em bolo e brigadeiro, demonstrou ser uma técnica eficiente na purificação dos extratos, não sendo necessárias etapas posteriores de clean-up.

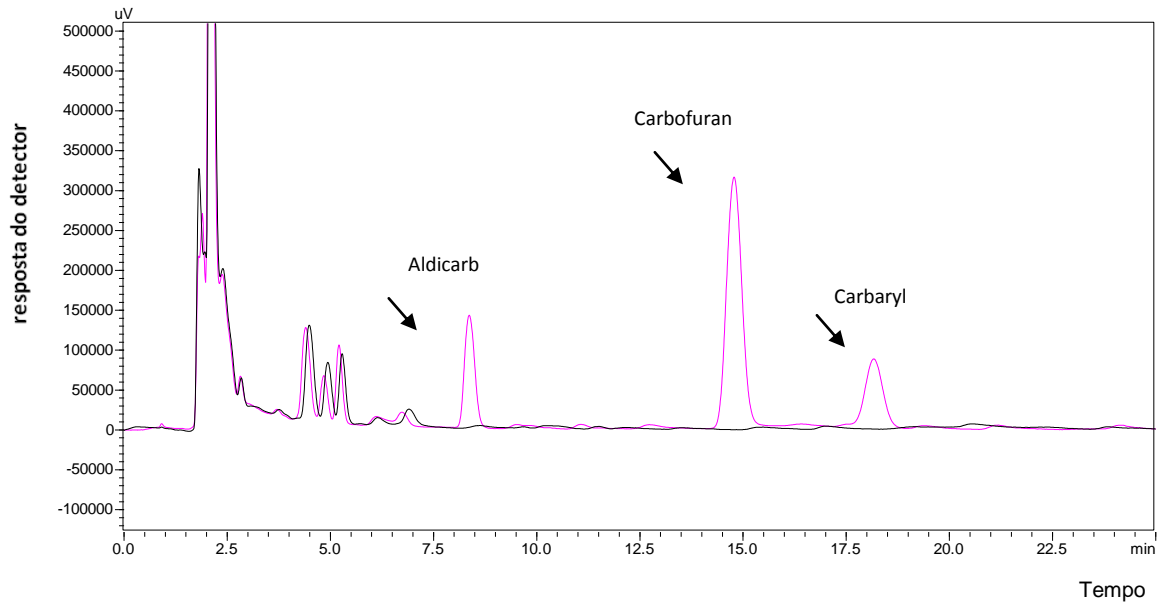
### 3.3.3 Validação do método otimizado

Após a otimização da ESL-PBT, o método proposto foi validado para o bolo e brigadeiro. Para isso, a 1,0 g de matriz foram adicionados 2,0 mL de água e esse sistema colocado em contato com 4,0 mL de acetonitrila. O sistema foi homogeneizado em mesa agitadora por 5 minutos. Após agitação, a amostra foi colocada em freezer por 3 horas para separação das fases. O extrato orgânico (1,0 mL) foi analisado por CLAE-UV.

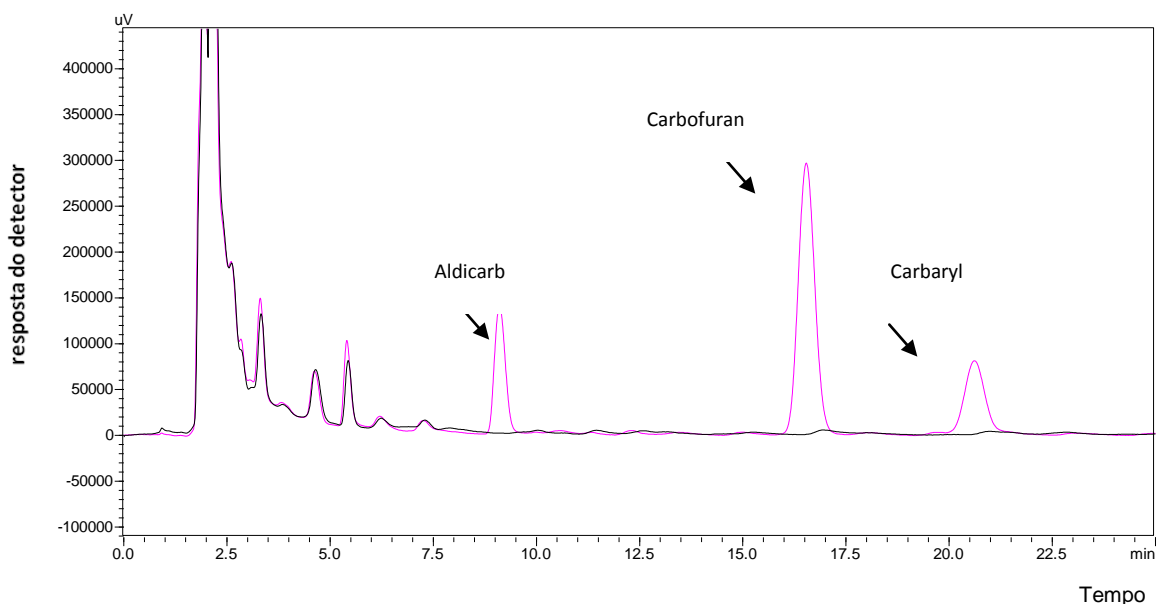
#### 3.3.3.1 Seletividade



A seletividade do método foi comprovada por comparação dos cromatogramas obtidos a 195 nm de amostras de bolo e brigadeiro fortificadas, com os de amostras livres de carbamatos (Figuras 3.4 e 3.5).



**Figura 3.4:** Cromatograma de um extrato obtido de bolo isento dos princípios ativos (\_\_\_) e cromatograma de um extrato de bolo fortificado com  $2500,0 \mu\text{g L}^{-1}$  dos carbamatos (\_\_\_).



**Figura 3.5:** Cromatograma de um extrato obtido de brigadeiro isenta dos princípios ativos (\_\_\_) e cromatograma de um extrato de brigadeiro fortificada com  $2500,0 \mu\text{g L}^{-1}$  dos carbamatos (\_\_\_).

Os extratos de bolo e brigadeiro não apresentaram picos nos tempos de retenção dos carbamatos, além disso, os cromatogramas dos extratos apresentaram uma resolução cromatográfica satisfatória, mostrando a seletividade da técnica ESL-PBT para matrizes mais complexas.

Diferenças nos tempos de retenção dos compostos são devidas às oscilações de pressão do aparelho que passou por manutenções na bomba durante um período do experimento, além disso, três colunas foram utilizadas durante esse trabalho. Entretanto, a cada três injeções de extratos, padrões dos carbamatos foram injetados no cromatógrafo a fim de se garantir a identidade dos compostos.

### 3.3.3.2 Limite de detecção, limite de quantificação e linearidade

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método proposto foram determinados, respectivamente, como sendo o valor igual a 3 e 10 vezes o sinal da linha de base (ruído) obtido para amostras de bolo e brigadeiro isentas de agrotóxicos (branco). Amostras fortificadas com carbamatos entre 1 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , foram submetidas à técnica de ESL-PBT e analisadas por CLAE-UV. Os limites de detecção para aldicarb, carbofuran e carbaryl foram respectivamente 15,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 12,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 8,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e os limites de quantificação foram, respectivamente, 50,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 40,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 25,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Tabela 3.2). Esses resultados foram semelhantes para as duas matrizes estudadas.

A linearidade do método foi avaliada analisando-se extratos obtidos a partir da ESL-PBT de amostras de bolo e brigadeiro fortificadas com agrotóxicos para se obter no extrato final as seguintes concentrações: 50,0; 100,0; 500,0; 750,0; 1000,0; 2000,0; 3000,0; 5000,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sendo cada concentração em três replicatas. Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para as curvas analíticas dos três agrotóxicos nas duas matrizes estudadas foram superiores a 0,99 (Tabelas 3.2 e 3.3).

Tabela 3.2 Equações lineares do método ESL-PBT para bolo

Agrotóxicos	Dados da calibração	
	Equações	R <sup>2</sup>
Aldicarb	$y = 223,25x - 751,8$	0,9991
Carbofuran	$y = 725,58x + 1656,8$	0,9961
Carbaryl	$y = 821,95x + 36466$	0,9970

Tabela 3.3. Equações lineares do método ESL-PBT para brigadeiro

Agrotóxicos	Dados da calibração	
	Equações	R <sup>2</sup>
Aldicarb	$y = 196,41x + 1139,7$	0,9944
Carbofuran	$y = 686,45x + 20070$	0,9982
Carbaryl	$y = 829,98x + 49201$	0,9998

A linearidade foi confirmada para as todas as curvas preparadas nesse trabalho. Todos os valores dispersos identificados foram confirmados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, não sendo observadas tendências nos gráficos exploratórios dos resíduos das regressões, após o tratamento dos dados. A premissa de que os resíduos da regressão devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner [23]. Os coeficientes de determinação obtidos foram superiores a 0,99. Estes resultados indicaram que o desvio da normalidade não foi significativo ( $p > 0,10$ ), permitindo o uso dos testes de hipóteses de t e F. A variabilidade dos resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração estudados foi constante, demonstrando homoscedasticidade. A estatística t de Levene não foi significativa ( $p > 0,05$ ) em todas as curvas examinadas. Independência dos resíduos da regressão foi evidenciada pelo teste de Durbin-Watson [26], uma vez que as distribuições dos pontos não apresentaram tendências positivas ou negativas. Assim, o uso do MMQO foi adequado para estimativa dos parâmetros das regressões.

### 3.3.3.3 Exatidão e precisão do método

Para determinar a exatidão do método, amostras de bolo e brigadeiro em triplicata (isentas de agrotóxicos) foram fortificadas com 100,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; 200,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; 1000,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  dos agrotóxicos. A taxa de recuperação obtida para o método proposto variou de 83 a 91%, com coeficientes de variação inferiores a 9%. A precisão do método foi determinada em termos do coeficiente de variação (CV) para nove extrações idênticas de amostra de matrizes fortificadas com 500,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e análise por CLAE-UV. Os resultados obtidos para bolo e brigadeiro estão apresentados nas Tabelas 3.4 e 3.5, respectivamente.

Tabela 3.4. Porcentagens de recuperação dos três agrotóxicos, após extração da amostra de bolo fortificada com quatro concentrações diferentes

Concentração	Recuperação média e CV (%)					
	Aldicarb		Carbofuran		Carbaryl	
Bolo ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )						
100,0 <sup>a</sup>	86,3	6,3	89,6	5,2	91,6	8,2
200,0 <sup>a</sup>	86,0	5,5	89,4	6,5	92,1	7,5
500,0 <sup>b</sup>	85,4	6,0	90,0	5,9	91,8	7,5
1000,0 <sup>a</sup>	85,9	5,8	91,2	6,2	91,9	8,5

<sup>a</sup>Resultados representam uma média de três repetições.

<sup>b</sup>Resultados representam uma média de nove repetições.

Tabela 3.5. Porcentagens de recuperação dos três agrotóxicos, após extração da amostra de brigadeiro em quatro concentrações diferentes

Concentração	Recuperação média e CV (%)					
	Aldicarb		Carbofuran		Carbaryl	
Brigadeiro ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )						
100,0 <sup>a</sup>	83,6	8,1	88,6	5,2	90,6	6,2
200,0 <sup>a</sup>	83,4	8,5	89,8	5,5	90,4	6,5
500,0 <sup>b</sup>	82,8	7,9	89,8	5,0	90,6	6,8
1000,0 <sup>a</sup>	83,7	7,2	88,9	5,9	91,2	5,6

<sup>a</sup>Resultados representam uma média de três repetições.

<sup>b</sup>Resultados representam uma média de nove repetições.

Os resultados apresentados nas Tabelas 3.4 e 3.5 não diferem entre si, em nível de 95% de probabilidade pelo teste t de Student, mostrando que a

porcentagem de recuperação independe do nível de concentração dos analitos nas amostras.

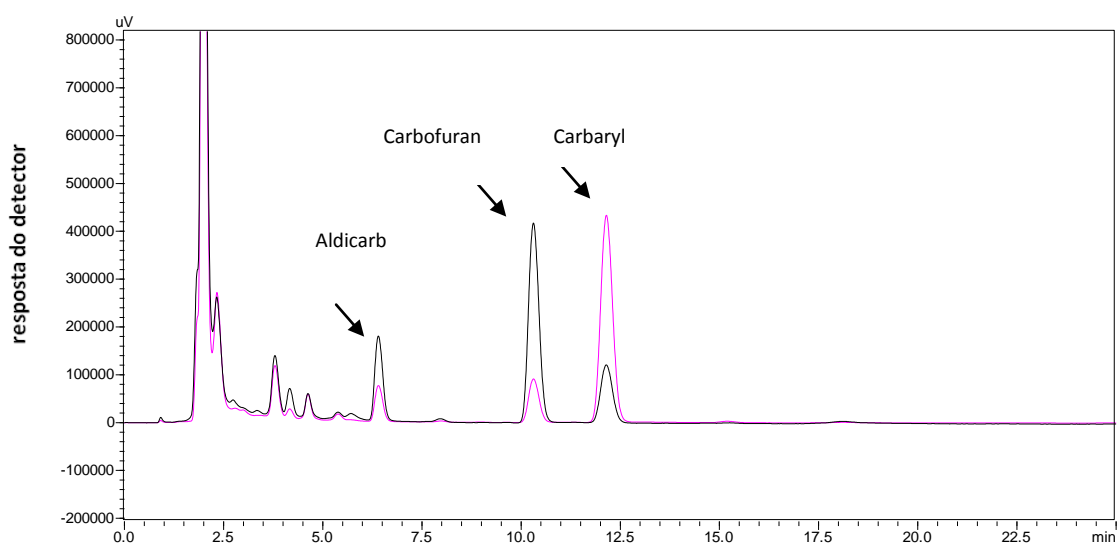
#### 3.3.3.4 Aplicação do método

O método validado foi aplicado em quatro amostras de bolo e quatro amostras de brigadeiro de diferentes procedências, isentas dos agrotóxicos fortificadas ao acaso, em triplicata, com os produtos comerciais dos carbamatos a fim de simular uma situação real de tentativa de envenenamento.

Em todas as amostras de bolo e brigadeiro extraídas pelo método ESL-PBT não houve interferências dos componentes dos produtos comerciais como pode ser observado pelos cromatogramas das Figuras 3.6 e 3.7 (bolo e brigadeiro respectivamente).

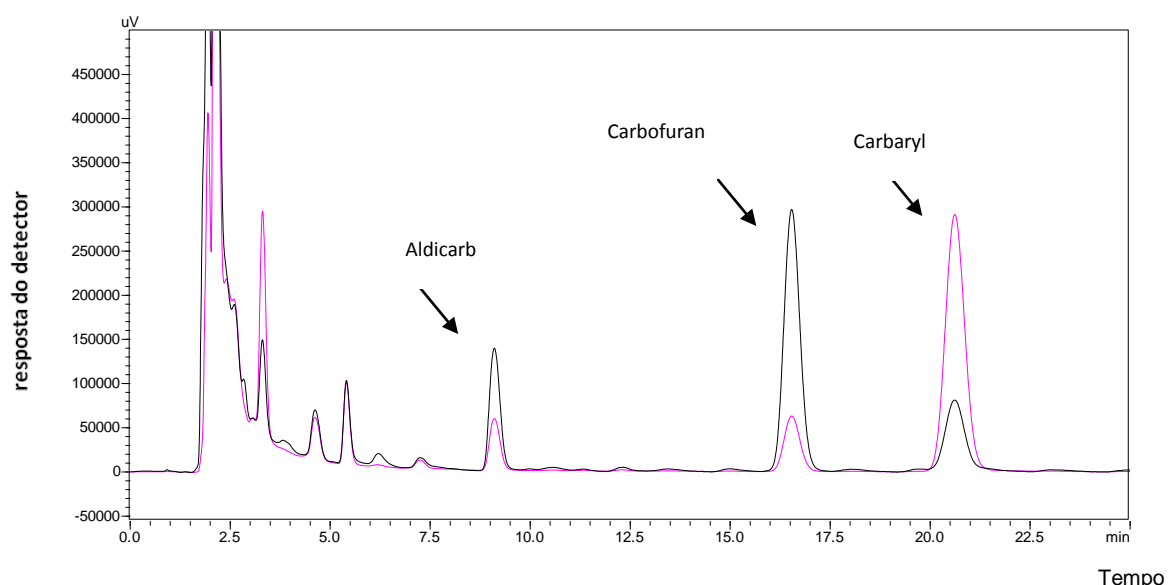
Um estudo paralelo foi realizado com três amostras de diferentes bolos (com chocolate granulado- tipo prestígio, com chocolate em pó e sem chocolate) a fim de se verificar diferenças entre a extração de bolos com características distintas. Não foi observada diferença entre as porcentagens de extração e cromatogramas obtidos para extratos de diferentes bolos.

Bombons com recheio de coco, de brigadeiro e recheio de nozes também foram avaliados. Não houve diferença entre os resultados obtidos para extratos de diferentes bombons, se comparados ao extrato de brigadeiro, o que confirma a robustez do método proposto para matrizes diferentes, mas com semelhanças na composição química e processamento.



Tempo

**Figura 3.6:** Cromatograma de um extrato obtido de bolo adicionado dos produtos comerciais dos carbamatos analisados a 195 nm (\_\_\_) e 213 nm (\_\_\_).



**Figura 3.7:** Cromatograma de um extrato obtido de brigadeiro adicionada dos produtos comerciais dos carbamatos analisados a 195 nm (\_\_\_) e 213 nm (\_\_\_).

### 3.4 CONCLUSÃO

A otimização da ESL-PBT, para extração de carbamatos em bolo, brigadeiro e similares por CLAE-UV, resultou em um método rápido, eficaz, seletivo. Além disso, o método proposto apresentou porcentagens de recuperação elevadas para os três carbamatos (superiores a 83%) e desvio-padrão relativo inferior a 9% nas duas matrizes estudadas. A grande vantagem dessa técnica é o baixo consumo de solventes (4,0 mL) para a extração dos agrotóxicos e a simplicidade da técnica. A modificação da polaridade da fase extratora (acetonitrila) não favoreceu a extração dos agrotóxicos. O aumento da força iônica pela adição de sal do meio não resultou em maior porcentagem de extração dos carbamatos. A etapa de adição de água foi necessária para melhorar a eficiência da extração. Finalmente, o método proposto possibilitou a quantificação de resíduos de aldicarb, carbofuran e carbaryl em amostras de diferentes tipos de bolos e brigadeiro.

### 3.5 REFERÊNCIAS

- [1] M. L. F. Oliveira, A. A. Buriola, Rev. Gaúcha Enferm. 30 (2009) 648-55.
- [2] B. D. Sabino, T. G. Torraca, C. M. Moura, H. F. Rozenbaum, M. V. C. Faria, J. Forensic Sci. (2010), Vol. 55, 808-812.
- [3] S. J. Lehotay, K. I. Eller. J AOAC Int 78 (1995) 821–30.
- [4] A. M. Fan, R. J. Jackson. Regul Toxicol Pharmacol. 9 (1989) 158–74.
- [5] E. Ballesteros, M. Gallego, M. Valcarcel. Anal Chem 65 (1993) 1773–1778.
- [6] J. H. Salas, M. M. Gonzalez, M. Noa, N. A. Perez, G. Diaz, R. J Agric Food Chem. 51(2003)4468–4471.
- [7] WHO. Environmental Health Criteria. Who Technical Report Series, N. 53, (1989). <[http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest53\\_e.htm](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest53_e.htm)>
- [8] E. Lacassie, P. Marquet, J. M, Gaulier, M. F. Dreyfuss, G. Lachatre, For. Sci. Int. 121 (2001) 116-125.
- [9] H.P.Vieira, A. A. Neves, M. E. L. R. Queiroz, Quím. Nova 30 (2007) 535-540.
- [10] S. M. Goulart, R. D. Alves, A. A. Neves, J. H. Queiroz, T. C. Assis, M. E. L. R. Queiroz, Anal. Chim. Acta 671 (2010) 41–47.
- [11] S. M. Goulart, M. E. L. R. Queiroz, A. A. Neves, J. H. Queiroz, Talanta 75/5 (2008) 1320-1323.
- [12] D. B. Marthe, L. M. Bittencourt, M. E. L. R. Queiroz, A. A. Neves, Quím. Nova (on line) 2010.  
< <http://quimicanova.sbq.org.br/qn/No%20Prelo/NT/NT09580.pdf>>
- [13] G. P. Pinho, A. A. Neves, M. E. L. R. Queiroz, F. O. Silvério, Food Chem. 121 (2010) 251–256
- [14] G. P. Pinho, A. A. Neves, M. E. L. R. Queiroz, F. O. Silvério, Food Control 21 (2010) 1307–1311
- [15] ANVISA, Portaria No. 1.469/2000 of 29 December. National Health Agency, Brazil.
- [16] INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.
- [17] ICH (International Conference on Harmonisation). Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95) 1995.

- [18] M. Thompson, S. L. R. Ellison, R. WOOD, *Pure & Appl. Chem.* 74 (2002) 835-855.
- [19] P. C. Meyer, R. E. Zund, *Statistical methods in analytical chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 1993. p. 81-134.
- [20] S. V. C. Souza, R. G. Junqueira, *Anal. Chim. Acta* 552 (2005) 25–35.
- [21] D. A. Belsley, E. Kuh, R. E. Welsch, *Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity*. New York: Wiley, 1980.
- [22] W. Horwitz, *Pure Appl. Chem.* 67, (1995) 331-343.
- [23] T. A. Ryan, B. L. Joiner, *Normal probability plots and tests for normality*. The State College: Pennsylvania State University, 1976.
- [24] H. Levene, *Robust tests for equality of variances*. In: Olkin, I.; Ghurye, S.G.; Hoeffding, W.; Madow, W.G.; Mann, H.B. (Ed.) *Contributions to probability and statistics*. Stanford: Stanford University Press, 1960.
- [25] M. B. Brown, A. B. Forsythe, *J. Am. Stat. Assoc.* 69 (1974). 364-367.
- [26] J. Durbin, G. S. Watson, *Biometrika* 38 (1951) 159-178.
- [27] N. Draper, H. Smith, *Applied regression analysis*. New York: Wiley. 1998.

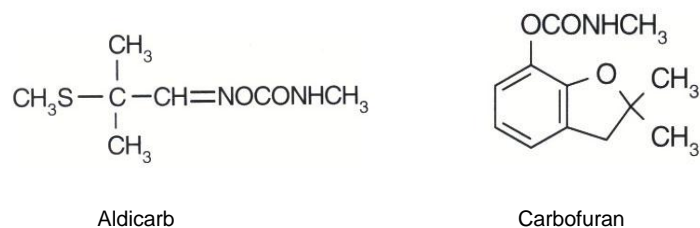


## **CAPÍTULO 4**

### **ESTABILIDADE DOS CARBAMATOS ALDICARB E CARBOFURAN EM ALIMENTOS E BEBIDAS**

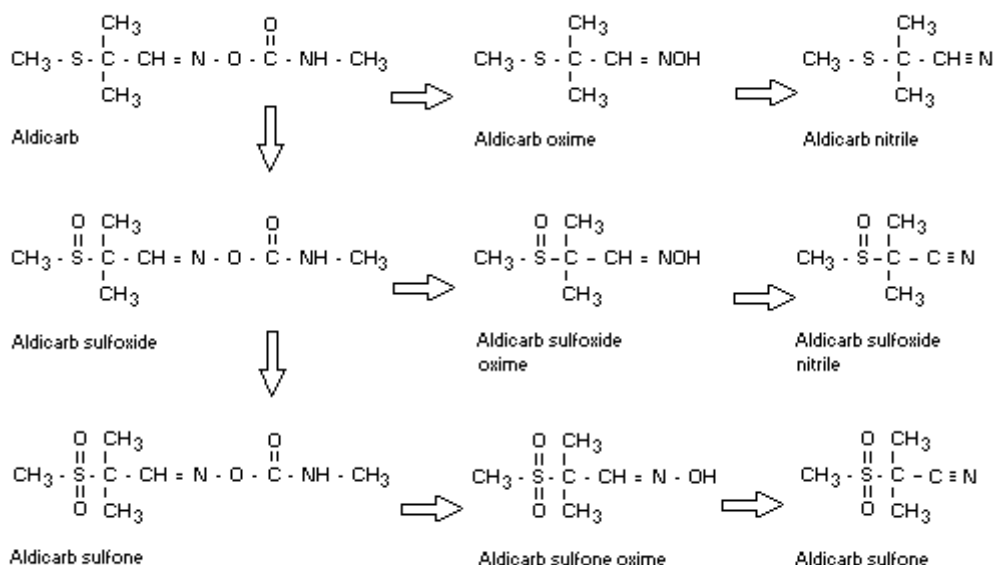
#### **4.1 INTRODUÇÃO**

Os carbamatos são inseticidas sistêmicos de uso controlado, utilizados principalmente nas culturas de batata, café e citros. Os carbamatos possuem alta eficiência no controle de pragas, sendo, porém tóxicos ao homem e animais, apesar de apresentarem degradação rápida no ambiente. Na Figura 4.1 são apresentadas as estruturas dos carbamatos aldicarb e carbofuran.



**Figura 4.1:** Estruturas químicas do aldicarb e carbofuran.

Os fatores mais associados à degradação desses compostos em águas são: temperatura e pH [1]. Os carbamatos são degradados rapidamente dependendo das condições físicas [2], químicas [3-5] e microbiológicas [6-7] do meio. O aldicarb, depois de sua aplicação, é rapidamente transformado em aldicarb sulfóxido e aldicarb sulfona, podendo ser degradado em oximas e nitrilas [8]. De modo geral são muito persistentes em águas subterrâneas, principalmente naquelas 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 [9]. Na Figura 4.2 são apresentados os produtos de degradação do aldicarb.

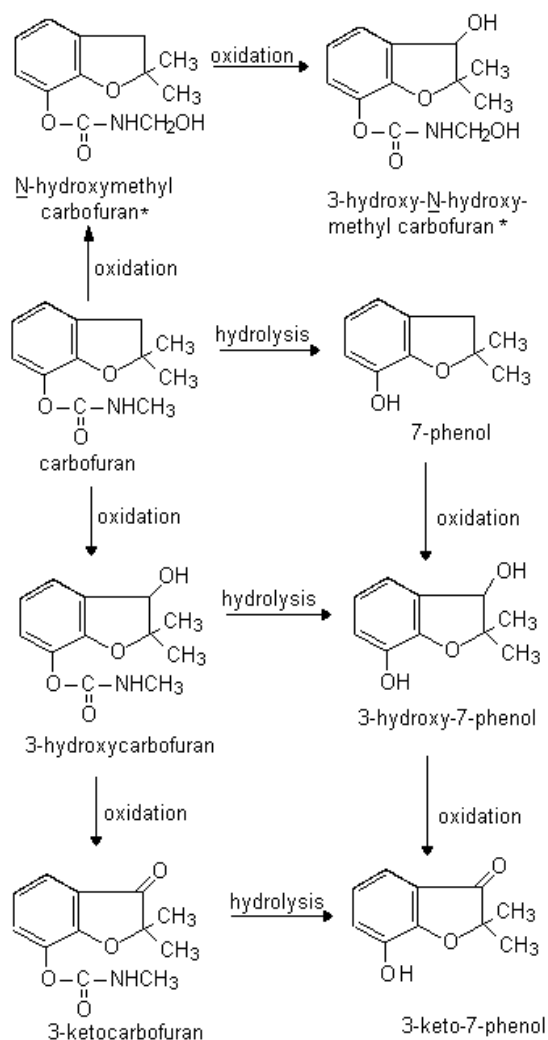


Fonte: WHO (modificada) <<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v079pr03.htm>> [1].

**Figura 4.2:** Produtos de degradação do aldicarb [1].

O principal metabólito do carbofuran é o 3-hidroxicarbofuran, quimicamente conhecido por 2,3-dihidro-2,2-dimetil-3-hidroxi-7-benzofuran.

Sua ocorrência se dá pelo processo de hidroxilação, o qual pode ser oxidado com a formação do 3-cetocarbofuran ou hidrolisado para formação do 3-hidroxi-7-fenol ou ainda a formação de conjugado [10]. Na Figura 4.3 são apresentados os principais produtos de degradação do carbofuran.



\*Produtos encontrados somente no metabolismo de ratos

Fonte: WHO (modificada) <<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v96pr03.htm>> [10].

**Figura 4.3:** Principais produtos de degradação do carbofuran [10].

Apesar de apresentarem degradação rápida e alta eficiência no controle de pragas, os carbamatos são tóxicos ao homem e aos animais [11]. Após degradação, alguns metabólitos são tão tóxicos quanto os próprios agrotóxicos. O aldicarb sulfóxido apresenta o valor de  $DL_{50}$  (0,9 mg/kg) igual ao aldicarb [12].

O aldicarb e carbofuran são os principais responsáveis pelos inúmeros casos de intoxicações acidentais, ocupacionais e dos crimes de homicídio e suicídio. Em função da coloração acinzentada das formulações dos produtos comerciais desses agrotóxicos, alimentos e bebidas de coloração escura são utilizados como veículo de envenenamento de animais e seres humanos [13]. Em casos de suspeita de envenenamento, essas amostras são conduzidas às Delegacias e posteriormente aos laboratórios de perícias dos Institutos de Criminalística.

Em função da degradação desses agrotóxicos, o conhecimento da estabilidade dos mesmos em diferentes matrizes é importante para os trabalhos da perícia. O adequado armazenamento das amostras até o momento da análise é um fator importante na preservação das características das mesmas para efeito de elucidação dos casos. Em função disso, esse trabalho teve como objetivo estudar a estabilidade do aldicarb e carbofuran em água mineral, suco de uva, achocolatado, bolo e brigadeiro, por um período de vinte e oito dias. Os fatores avaliados na estabilidade desses carbamatos foram, além das diferentes matrizes, a temperatura de armazenamento, a adição de sal e a luz. Além disso, avaliou-se a estabilidade dos compostos em função do pH de soluções aquosas por um período de vinte e oito dias.

A extração dos carbamatos em água, suco de uva e achocolatado foi realizada pela técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) [14,15]. Na extração dos carbamatos em bolo e brigadeiro foi utilizada a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) [16,17]. A análise foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector ultravioleta (CLAE-UV).

## **4.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.2.1 Equipamentos**

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido Shimadzu LC 20AT equipado com um detector UV/VIS Shimadzu SPD 20A, forno da coluna, Shimadzu CTO

10ASVP, injetor automático Shimadzu SIL 10AF; sistema de integração Lab Solutions da Shimadzu; Banho ultra-sônico Maxi Clean 750- Unique (saída de 150 W e frequência de 33 kHz); mesa agitadora (Tecnal TE – 420, São Paulo, Brasil) a 25 °C e 175 oscilações por minuto; e vortex (Certomat® MV).

#### 4.2.2 Condições cromatográficas

As seguintes condições cromatográficas foram ajustadas para determinação simultânea de aldicarb e carbofuran por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência): Coluna Phenomenex Luna 3um C18, 100 A 150 x 4,6 mm; fase móvel: água purificada: acetonitrila 65:35 v:v, vazão da fase móvel: 0,8 mL min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna: 35 °C e volume de injeção 20 µL. Detector de UV a 195 nm.

#### 4.2.3 Reagentes e soluções

As soluções padrão estoque na concentração de 1000,0 mg L<sup>-1</sup> de aldicarb e carbofuran foram preparadas individualmente em acetonitrila (J.T. Baker, grau HPLC) e armazenadas em freezer. A partir de diluição das soluções estoque foi preparada uma solução padrão de trabalho contendo os carbamatos na concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup>. As demais soluções foram preparadas a partir da solução de trabalho.

As soluções empregadas foram preparadas a partir de padrões de aldicarb (99,9% m/m – Sigma Aldrich), carbofuran (99,9% m/m – Sigma Aldrich), utilizando como solvente acetonitrila (J.T. Baker, grau HPLC). A acetonitrila também foi empregada como solvente extrator.

Para o experimento de estabilidade foram utilizados os produtos comerciais dos carbamatos aldicarb (Temik® 150) e carbofuran (Furadan® 100 G).

#### 4.2.4 Preparo de amostras

4.2.4.1 Estabilidade do aldicarb e carbofuran em água mineral em função do pH

Um estudo de estabilidade foi conduzido para o aldicarb e carbofuran em água mineral a diferentes valores de pH (2,6; 4; 6; 8; 10 e 12) e em duas temperaturas (25 °C e 4 °C) por um período de vinte e oito dias.

Doze amostras de água mineral (60,0 mL) tiveram os seus valores de pH ajustados para: 2,6; 4; 8; 10 e 12. O valor de pH=6 não foi ajustado, uma vez que a água mineral apresentou esse valor de pH. O pH do meio foi ajustado com soluções de ácido clorídrico e de hidróxido de sódio. Posteriormente, foram fortificadas com os produtos comerciais Temik e Furadan (80,0 mg L<sup>-1</sup> e 600,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente). Seis amostras foram armazenadas em geladeira (4 a 10 °C) e seis à temperatura de (25 ± 3 °C).

As extrações, em triplicata, foram realizadas após 1 hora, 12 horas, 24 horas, 3 dias, 5, 10, 15, 21 e 28 dias após a aplicação dos produtos comerciais às soluções aquosas em diferentes valores de pH. As amostras foram extraídas conforme descrito no item 4.2.5.1. Os resultados obtidos para a amostra submetida ao processo de extração no primeiro dia (tempo zero), em diferentes valores de pH, foi considerado 100% e a estabilidade nos demais dias foi avaliada através da porcentagem relativa considerando o primeiro dia.

#### 4.2.4.2 Amostras líquidas: Água, achocolatado e suco de uva.

Duas amostras de cada matriz, com e sem sal, foram armazenadas em freezer (-20 ± 3 °C), duas em geladeira (4 a 10 °C), duas foram mantidas à temperatura ambiente (22 ± 5 °C) na presença de luz e duas foram mantidas à temperatura ambiente (22 ± 5 °C) na ausência de luz.

As amostras, isentas dos carbamatos, foram fortificadas com os produtos comerciais Temik e Furadan para se obter uma concentração de 80 mg L<sup>-1</sup> e 600 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Em seguida, adicionou-se sal (1,5% de NaCl) nos frascos submetidos a esse tratamento.

A presença de luz foi simulada por uma lâmpada incandescente de intensidade 60 W. Para simular ausência de luz as amostras foram armazenadas em frascos de vidro âmbar cobertos com papel alumínio.

O pH de todas as amostras foi verificado antes das extrações durante o período do experimento.

As extrações em triplicata foram realizadas após 1 hora, 12 horas, 24 horas, 3 dias, 5, 10, 15, 21 e 28 dias após a aplicação dos produtos comerciais, em três temperaturas (22 °C, 4 °C e -20 °C), na presença e ausência de sal (1,5 % de NaCl). Para os tratamentos à temperatura de 22 °C, foi verificado o efeito da presença e ausência de luz na estabilidade dos carbamatos.

#### 4.2.4.3 Amostras sólidas: Bolo e brigadeiro

Foram preparados 217 frascos de vidro com tampa e em cada frasco foi adicionado 1,0000 g de amostra sólida (bolo ou brigadeiro de marcas comerciais). A cada frasco (exceto um) foi adicionado 0,3000 g da mistura dos produtos comerciais Temik e Furadan (33,0000 g de cada produto comercial triturados e homogeneizados).

Cinquenta e quatro amostras de cada matriz foram armazenadas em freezer ( $-20 \pm 3$  °C), 54 amostras em geladeira (4 a 10 °C), e 108 à temperatura ambiente ( $22 \pm 5$  °C). Nesse último tratamento à temperatura ambiente foi verificado também o efeito da presença e ausência de luz, deixando 54 amostras sob o efeito de uma lâmpada incandescente de intensidade 60 W, e 54 amostras foram então armazenadas em frascos de vidro âmbar cobertos com papel alumínio para impedir a passagem de luz.

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

#### 4.2.5 Extração dos carbamatos

A extração dos carbamatos em todas as matrizes foi realizada pela técnica extração com partição em baixa temperatura e a análise foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector ultravioleta (CLAE-UV). A extração e análise de cada matriz foi otimizada e validada previamente. O resultado obtido para a amostra submetida ao processo de extração no primeiro dia (tempo zero) foi considerado 100%.

Os gráficos e os modelos matemáticos das regressões não lineares foram construídos utilizando o programa Sigma Plot 11.0.

#### 4.2.5.1 Extração dos carbamatos em água mineral

A 2,00 mL de água mineral (na ausência e presença de 1,5% de NaCl) previamente preparada como descrito no item 4.2.4.1, foi adicionado 4,00 mL de acetonitrila. Essa solução foi mantida em banho ultrassônico por 10 min. Posteriormente a mistura foi levada ao freezer a aproximadamente -20 °C por 3 h. Após esse período, retirou-se 1,0 mL da fase orgânica para análise por CLAE-UV.

#### 4.2.5.2 Extração dos carbamatos em achocolatado e suco de uva

A 2,00 mL de bebida (na ausência e presença de 1,5% de NaCl) previamente preparada como descrito no item 4.2.4.2, adicionou-se 4,00 mL de acetonitrila. O sistema foi homogeneizado no vortex por 60 segundos. Após agitação, a amostra foi colocada em freezer por 3 horas para separação das fases. O extrato orgânico (1,0 mL) foi analisado por CLAE-UV.

#### 4.2.5.3 Extração dos carbamatos em bolo e brigadeiro

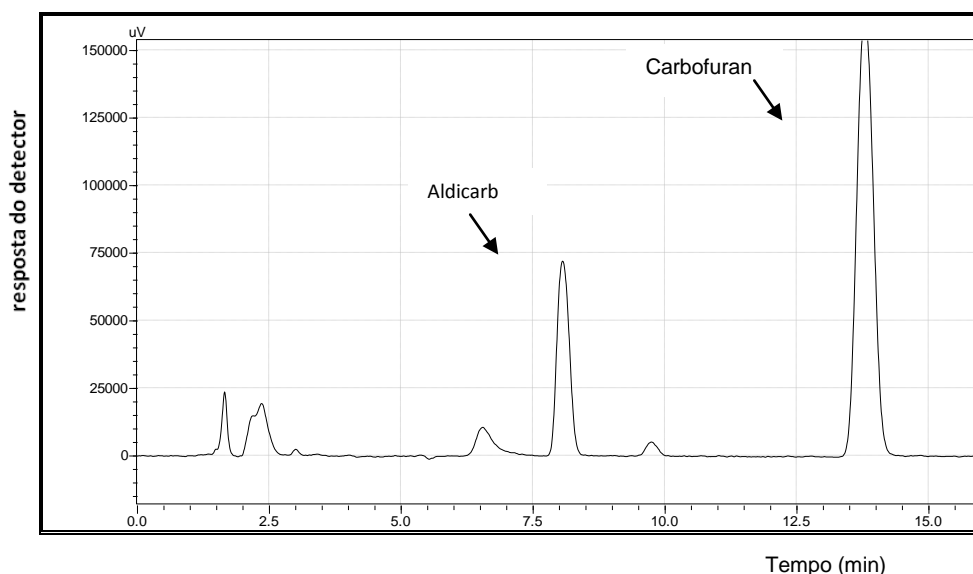
Em cada frasco previamente preparado como descrito no item 4.2.4.3, contendo 1,0000 g de matriz sólida foram adicionados 2,00 mL de água e esse sistema colocado em contato com 4,00 mL de acetonitrila. O sistema foi homogeneizado em mesa agitadora por 5 minutos. Após agitação, a amostra foi colocada em freezer por 3 horas para separação das fases. O extrato orgânico (1,0 mL) foi analisado por CLAE-UV.

### **4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 4.3.1 Análise cromatográfica



As condições cromatográficas otimizadas para análise simultânea dos carbamatos permitiram uma boa separação dos princípios ativos conforme o cromatograma apresentado na Figura 4.4.

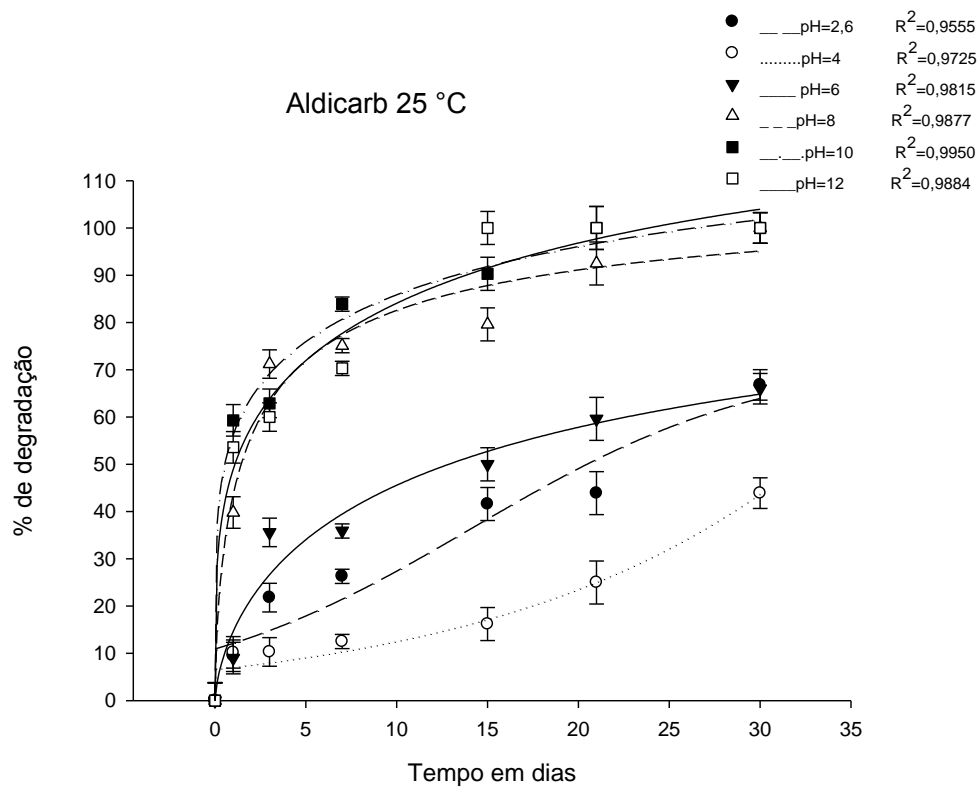
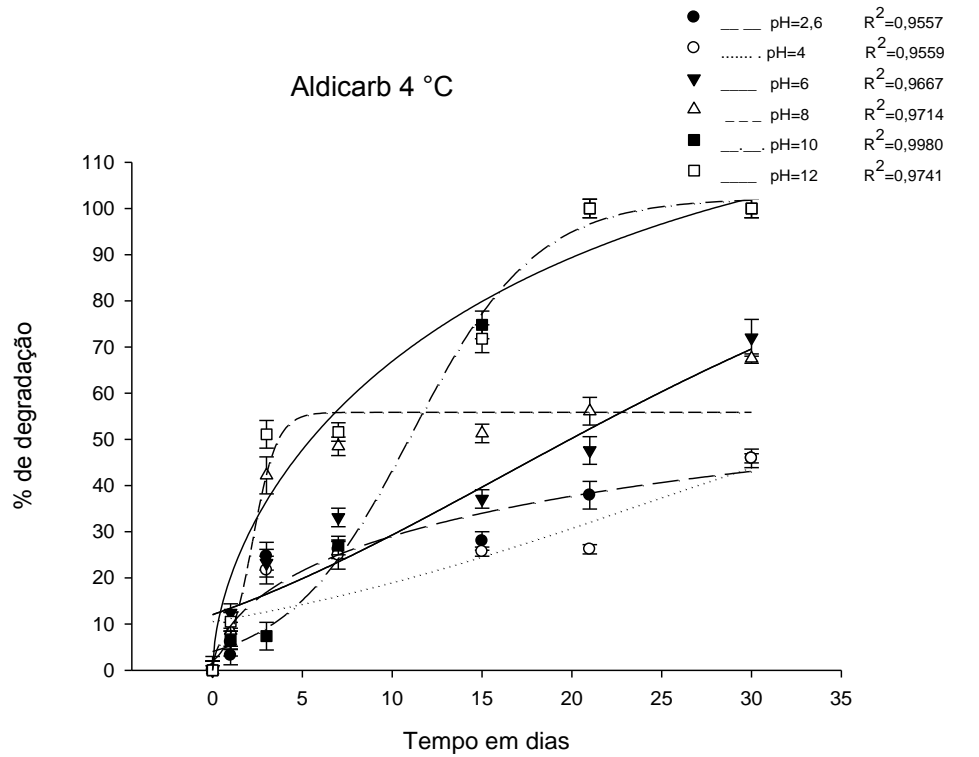


**Figura 4.4.** Cromatograma de uma solução padrão a  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  de aldicarb ( $t_R = 7,935 \text{ min}$ ), carbofuran ( $t_R = 13,491 \text{ min}$ ).

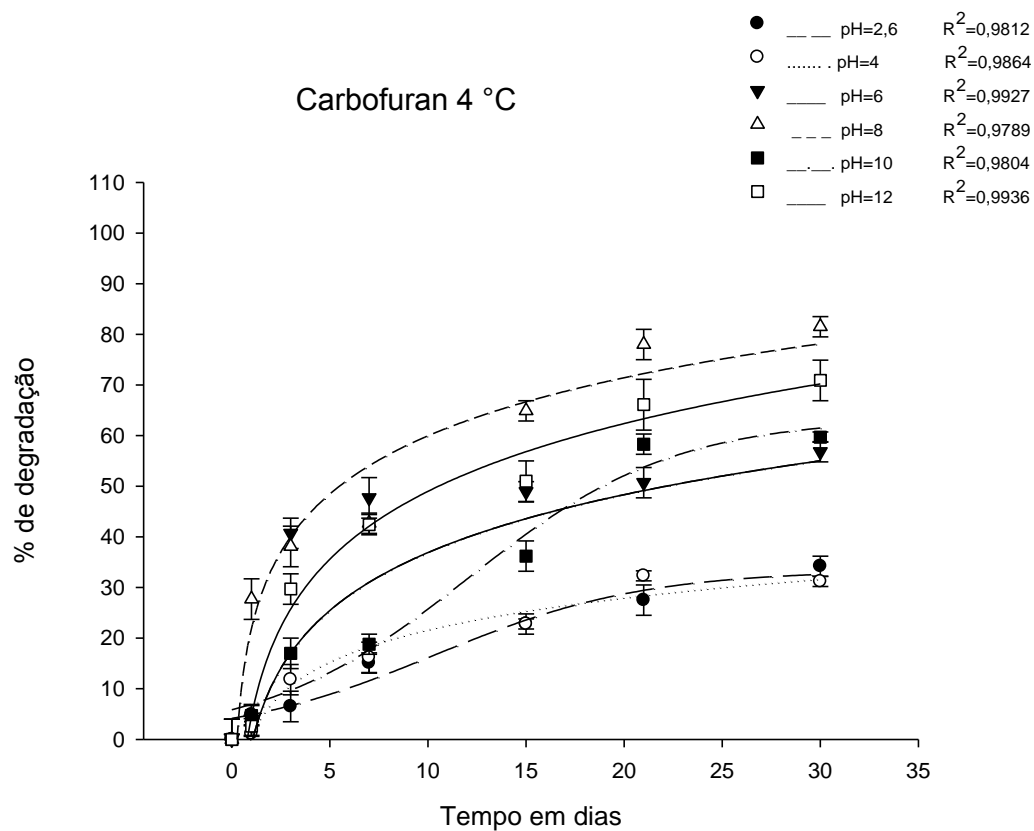
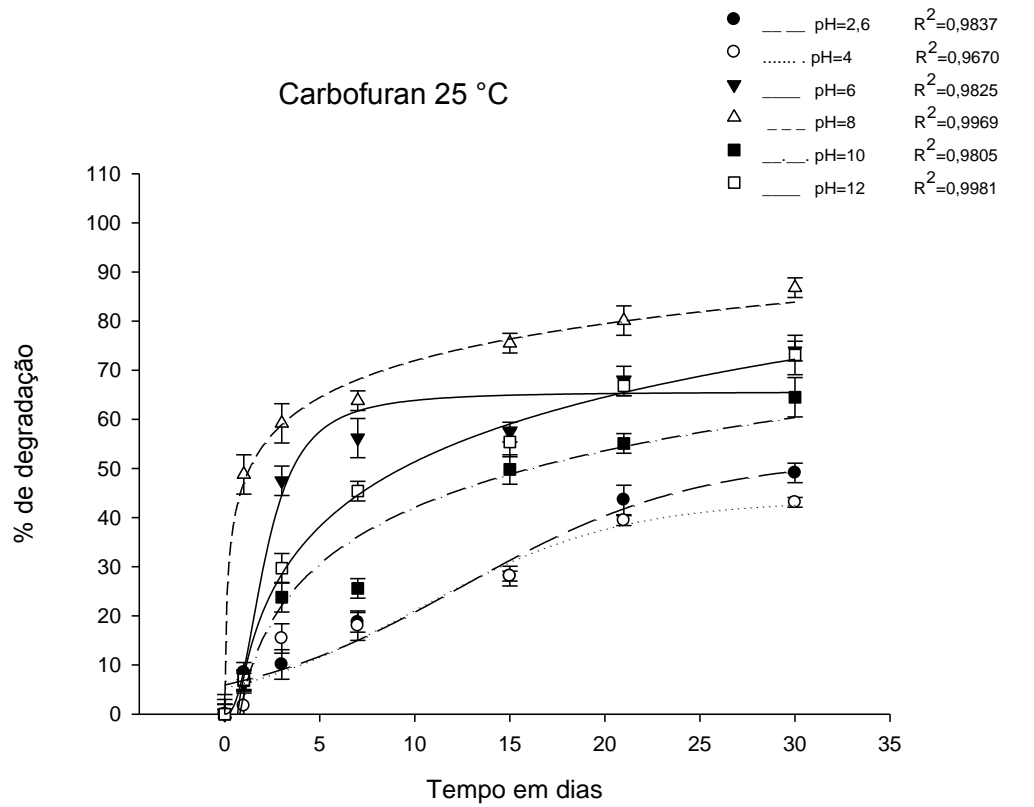
Os picos, com tempos de retenção ( $t_R$ ) iguais a 7,935 e 13,491 min correspondem à aldicarb e carbofuran, respectivamente. Na detecção desses carbamatos, o comprimento de onda utilizado foi 195 nm.

#### 4.3.2 Estabilidade dos carbamatos em água a diferentes valores de pH

Os resultados do experimento de estabilidade de aldicarb e carbofuran em água conduzido em diferentes valores de pH a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  são apresentados nas Figuras 4.5 e 4.6. Desses dados foram ajustadas as equações matemáticas para descrever os fenômenos. Na Tabela 4.1 estão apresentadas para cada carbamato e cada condição as equações ajustadas.



**Figura 4.5** Estudos de degradação de aldicarb em água em diferentes valores de pH, a 25 e 4 °C.



**Figura 4.6:** Estudos de degradação de carbofuran em água em diferentes valores de pH, a 25 e 4 °C.

**Tabela 4.1:** Equações não lineares dos experimentos de degradação dos carbamatos em água em diferentes valores de pH a 22 e 4 °C

pH	Aldicarb	Carbofuran
	25 °C	
2,6	$y=73,1212/(1+e^{-(x-14,1800)/8,1549})$	$y=52,2881/(1+e^{-(x-12,5591)/6,1129})$
4,0	$y=922,2044/(1+e^{-(x-76,7203)/15,5839})$	$y=43,6554/(1+e^{-(x-10,2757)/5,2685})$
6,0	$y=105,5529/(1+(x/15,0380)^{-0,6740})$	$y=65,5847/(1+(x/2,1891)^{-2,3779})$
8,0	$y=111,2817/(1+(x/1,9792)^{-0,6518})$	$y=47,0014 + 10,8369\ln x$
10,0	$y=115,8588 (1 - e^{(-0,0238 \cdot x^{0,1931})})$	$y=3,7431 + 16,6533\ln x$
12,0	$y=120,7246 (1 - e^{(-0,0264 \cdot x^{0,2477})})$	$y=7,5797 + 19,0126\ln x$
4 °C		
2,6	$y=88,4788/(1+(x/32,7122)^{-0,6041})$	$y=33,3894/(1+e^{-(x-10,3587)/5,3002})$
4,0	$y=72,7887/(1+e^{-(x-24,1881)/13,7125})$	$y=0,7436+9,0946\ln x$
6,0	$y=96,5796/(1+e^{-(x-19,5085)/10,6220})$	$y=51,0252/(1+e^{-(x-2,3531)/0,4715})$
8,0	$y=55,8564/(1+e^{-(x-2,2293)/0,6782})$	$y=21,8037+16,5661\ln x$
10,0	$y=102,2314/(1+e^{-(x-11,0826)/3,4787})$	$y=63,5026/(1+e^{-(x-12,0179)/5,2593})$
12,0	$y=125,5892 (1 - e^{(-0,0395 \cdot x^{0,5624})})$	$y=4,5175+19,3138\ln x$

Observa-se pelos resultados (Figura 4.5) que a degradação do aldicarb é maior à temperatura de 25 °C nos primeiros dias do experimento, chegando a 70% em meio alcalino, independentemente da temperatura. Observa-se também que após 3 dias, em pH acima de 8 e a 25 °C, a degradação do aldicarb foi maior que 50%.

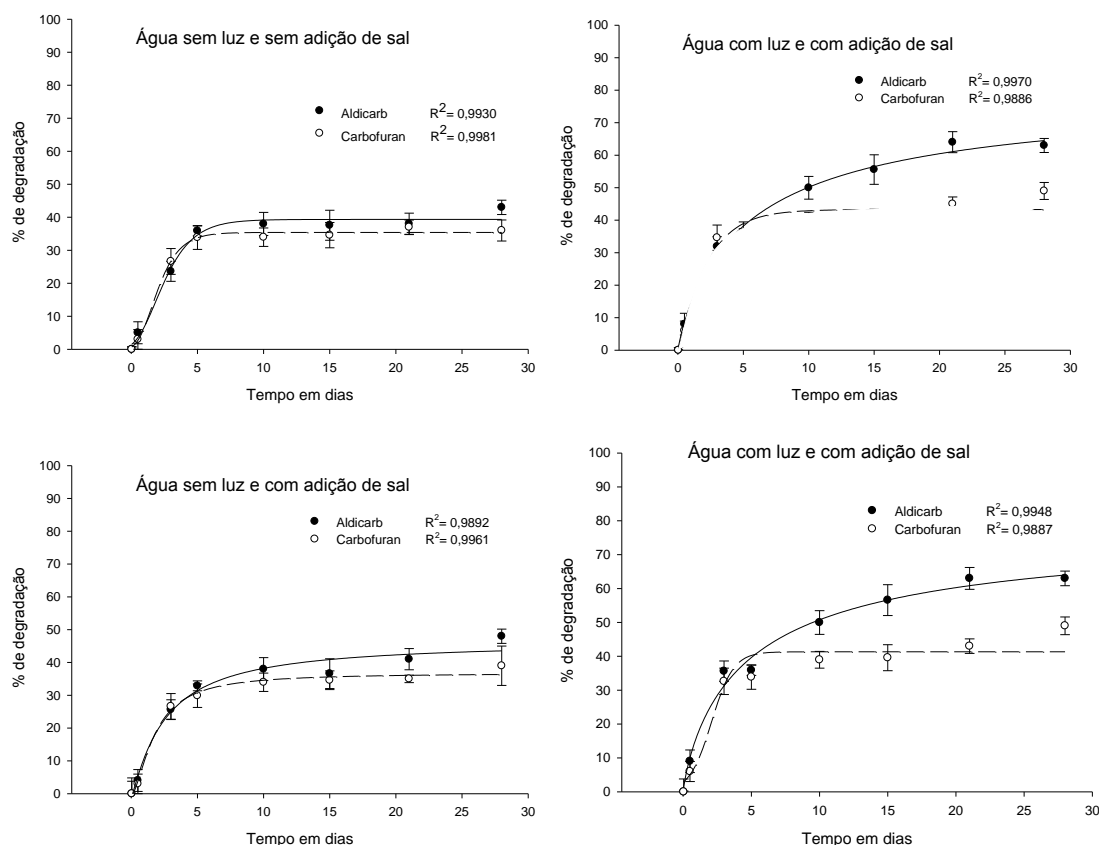
Resultados semelhantes apresentados na Figura 4.6 foram obtidos para o carbofuran, embora para esse composto, a degradação seja menos acentuada do que a do aldicarb. Em valores de pH próximos ao da água natural (pH=5,5-6,0) esta degradação é mais lenta para todos os compostos nas duas temperaturas estudadas.

A temperatura é um fator que influencia a velocidade de hidrólise, contribuindo com um aumento de 35% para cada grau centígrado acima da temperatura ambiente [18].

Segundo WHO (1989) essas substâncias são estáveis em condições ácidas e instáveis em condições alcalinas, como observado nesse estudo. Entretanto, esse estudo mostra que em pH 4 estes compostos são mais estáveis do que em pH próximos de 2, principalmente para o aldicarb. O pH é um parâmetro importante a ser considerado quando se avalia a permanência de resíduos de carbofuran em águas superficiais. A meia vida do carbofuran em água a 22 °C é de aproximadamente 12 meses em pH 4,0, 121 dias em pH 7,0 e 31 horas em pH 9,0 [19], confirmando os dados obtidos neste estudo.

#### 4.3.3 Estabilidade dos carbamatos em água

Os dados da degradação dos carbamatos em função da luz e da adição de sal a 22 °C estão apresentados na Figura 4.7. Desses dados foram ajustadas equações matemáticas para descrever os fenômenos. Na Tabela 4.2 estão apresentadas para cada carbamato e cada condição as equações ajustadas.



**Figura 4.7:** Efeito da luz e da adição de sal na estabilidade dos carbamatos em amostras de água armazenadas a 22 °C.

**Tabela 4.2:** Equações não lineares dos experimentos de degradação dos carbamatos em água

	Aldicarb	Carbofuran
Água sem luz e sem AD*	$y = 39,3478.e^{-e^{-(x-1,8504)/15336}}$	$y = 35,4127.e^{-e^{-(x-1,5748)/11272}}$
Água com luz e sem AD	$y = 80,0090.x^{0,8810}/(5,5486^{0,8810} + x^{0,8810})$	$y = 45,4850.x^{1,3860}/(1,6445^{1,3860} + x^{1,3860})$
Água sem luz e com AD	$y = -1,1839 + 47,6360/1 + (x/2,5302)^{-1,1374}$	$y = -0,5502 + 37,3225/1 + (x/1,7887)^{-1,6106}$
Água com luz e com AD	$y = 79,0103.x^{0,8384}/(4,9650^{0,8384} + x^{0,8384})$	$y = 46,0205.x^{1,2253}/(1,8844^{1,2253} + x^{1,2253})$
Água 4 °C sem AD	$y = 5,1257 + 25,0708.x^{1,7553}/(8,6215^{1,7553} + x^{1,7553})$	$y = 0,1241 + 20,6335.x^{1,2724}/(3,4848^{1,2724} + x^{1,2724})$
Água 4 °C com AD	$y = -1,9313 + 93,5718.x^{0,5408}/(94,1892^{0,5408} + x^{0,5408})$	$y = -0,6851 + 26,9387.x^{0,8329}/(5,4040^{0,8329} + x^{0,8329})$
Água -20 °C sem AD	$y = 0,0974 + 2,1236/(1 + e^{-(x-3,4361)/1,0177})$	$y = 0,0992 + 1,9420/(1 + e^{-(x-3,9487)/0,4398})$
Água -20 °C com AD	$y = 0,0541 + 2,1408/(1 + e^{-(x-3,3708)/0,9807})$	$y = 0,19901 + 2,1171/(1 + e^{-(x-4,37824,3782)/0,4625})$

AD= Adição de sal

Observa-se que nos primeiros 5 dias a degradação dos princípios ativos é semelhante na presença e ausência de luz, sendo degradados cerca de 30%. Após 5 dias, não se observa degradação acentuada para os princípios ativos na ausência de luz. Por outro lado, a partir de 5 dias, em presença de luz o aldicarb se degrada no decorrer dos 28 dias, chegando a 70% no final do experimento, e o carbofuran aproximadamente 50%.

Estudos realizados por Bertrand e Barceló (1991) [20] e Bachman e Patterson (1999) [21] mostraram que a luz foi um fator importante no processo de degradação de carbamatos em água e em solo, respectivamente. Segundo Mahalakshmi et. al [22], a porcentagem de degradação aumenta com o aumento da intensidade de luz até 64 W, uma vez que aumenta a probabilidade de excitação dos elétrons assim como a re-excitação dos elétrons recombinados aumentando assim a fotólise.

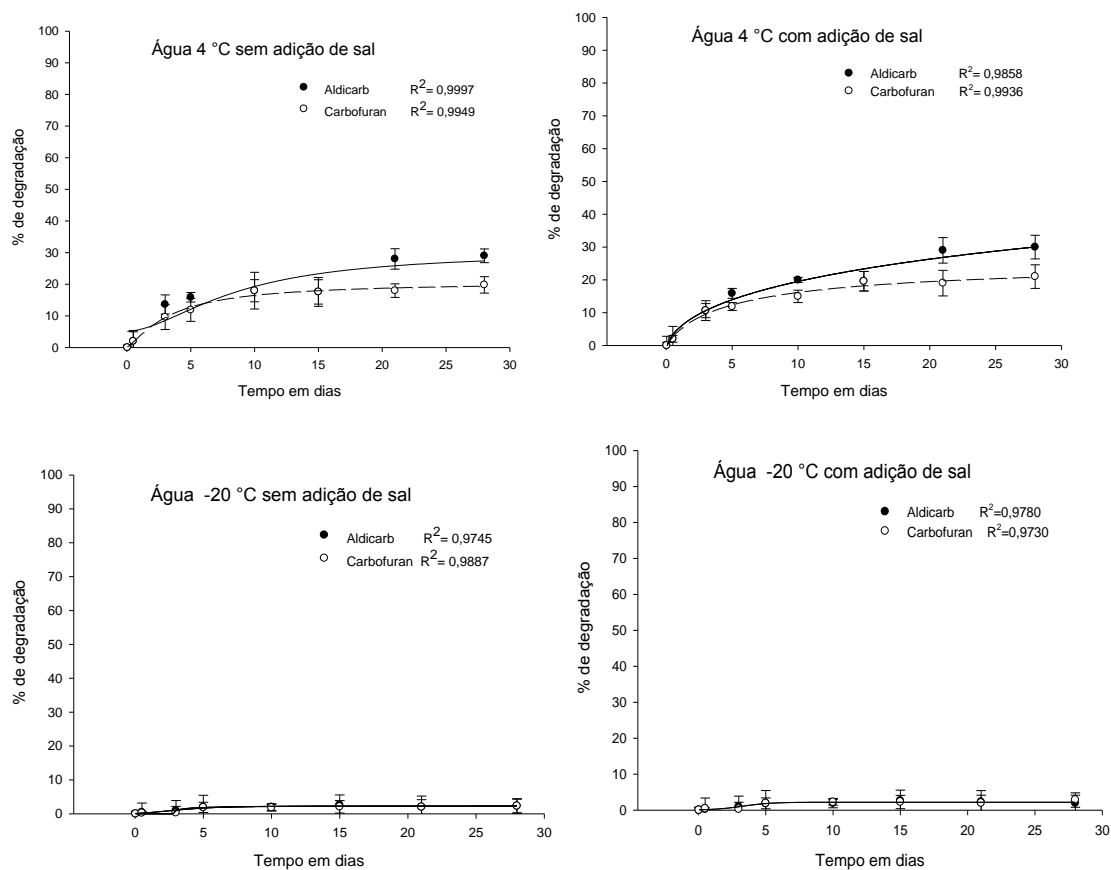
A adição de sal na concentração avaliada (1,5% de NaCl), não influenciou na degradação dos carbamatos em água, independente da presença ou ausência da luz. Na extração de carbamatos em água por ELL-PBT [14] a adição de sal (1,5% de NaCl) aumenta a porcentagem de extração uma vez que provoca uma redução da solubilidade do analito na matriz, facilitando a sua extração. Por outro lado, a presença de sal no meio pode afetar o crescimento microbiano, alterando o processo natural de degradação, entretanto não foi observada nenhuma alteração nas condições do experimento.

Moreira et. al (2004) [23] estudando a degradação hidrolítica do carbofurano em águas naturais mostrou que variações na concentração de sais, podem produzir um efeito tampão, tornando a hidrólise mais lenta. Entretanto, nesse estudo, esse efeito não foi observado.

O pH inicial da água mineral foi igual a 6,0, não variando até os primeiros 15 dias do experimento. A partir daí o pH aumentou para 6,1 permanecendo nesse valor até o final do experimento.

Na Figura 4.8 estão apresentados os efeitos de temperaturas (4 °C e -20 °C) e da adição de sal na degradação dos carbamatos. À temperatura de refrigeração (4 °C), ocorre uma degradação de 15 a 20% nos primeiros dias do experimento, chegando a 30% de degradação aos 28 dias. Foi observado que a adição de sal não afeta a estabilidade desses princípios ativos. A -20 °C, nos primeiros dias do experimento ocorre uma perda de aproximadamente 2% para

os dois carbamatos estudados, não ultrapassando 3,0% até 28 dias do experimento. Observa-se que o congelamento é uma excelente forma de se preservar amostras contendo carbamatos antes de serem submetidas as procedimentos de extração e análise.



**Figura 4.8:** Efeito da temperatura e da adição de sal na estabilidade do Aldicarb e Carbofuran em amostras de água armazenadas a 4 °C e a -20 °C.

Na Figura 4.8, pode-se verificar que quanto maior a temperatura, maior a degradação dos carbamatos. O aumento da temperatura provoca o aumento da velocidade das reações químicas e favorece os processos endotérmicos. Além disso, verifica-se que a degradação de Aldicarb foi mais acentuada que a do Carbofuran na maioria dos tratamentos. Isso provavelmente porque o Aldicarb hidrolisa-se mais facilmente que o Carbofuran, uma vez que esse apresenta anel benzênico em sua molécula, o que confere maior estabilidade.

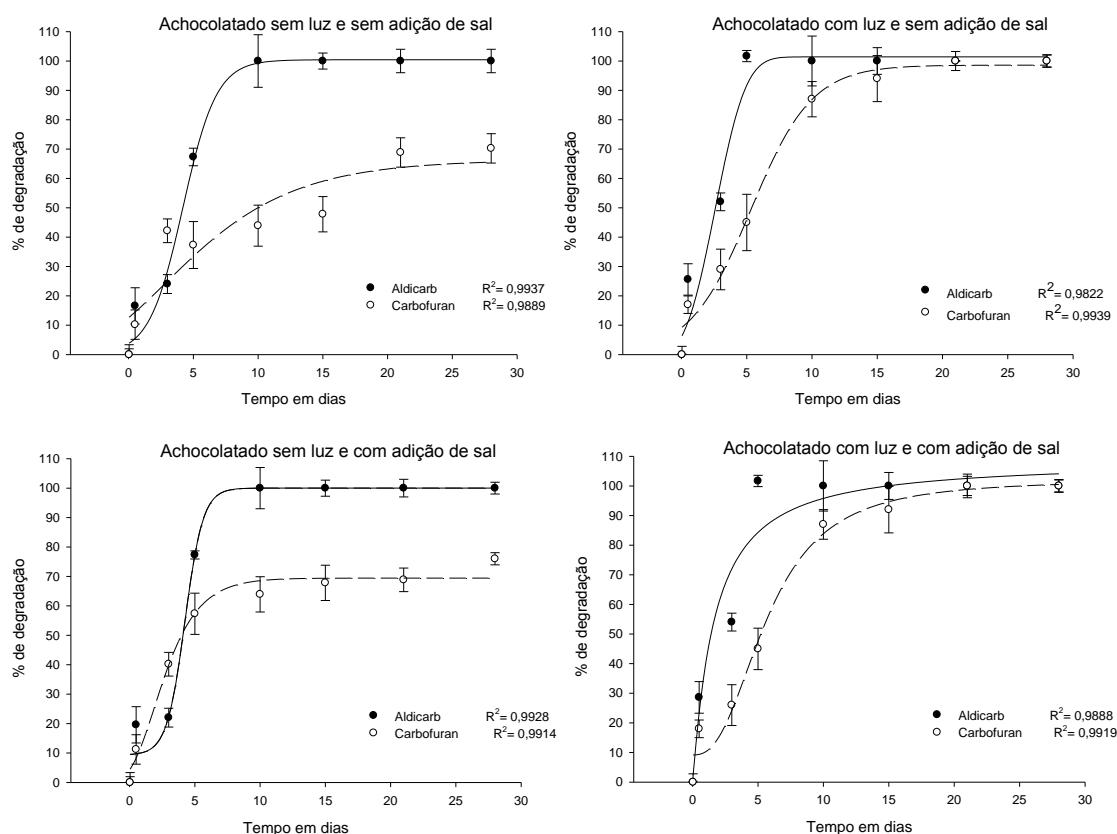
A -20 °C foi observada uma baixa degradação para os dois compostos. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo da estabilidade de Aldicarb e Carbofuran em café bebida [24].



#### 4.3.4 Estabilidade dos carbamatos em achocolatado

Os estudos do efeito da luz e da adição de sal na estabilidade dos carbamatos em achocolatado foram realizados a 22 °C. Observa-se pela Figura 4.9 que nos primeiros dias a degradação do aldicarb é semelhante na presença e ausência de luz, sendo degradados cerca de 100% em 5 dias. Desses dados foram ajustadas equações matemáticas para descrever os fenômenos. Na Tabela 4.3 estão apresentadas para cada carbamato e cada condição as equações ajustadas. Após 10 dias, esse composto se degradou totalmente. Para o carbofurano, a presença de luz aumentou a degradação aproximadamente 40% aos 15 dias, sendo que na presença de luz, após esse período houve degradação completa do carbofurano.

A adição de sal na concentração avaliada (1,5% de NaCl), não influenciou na degradação dos carbamatos em achocolatado, independente da presença ou ausência da luz.



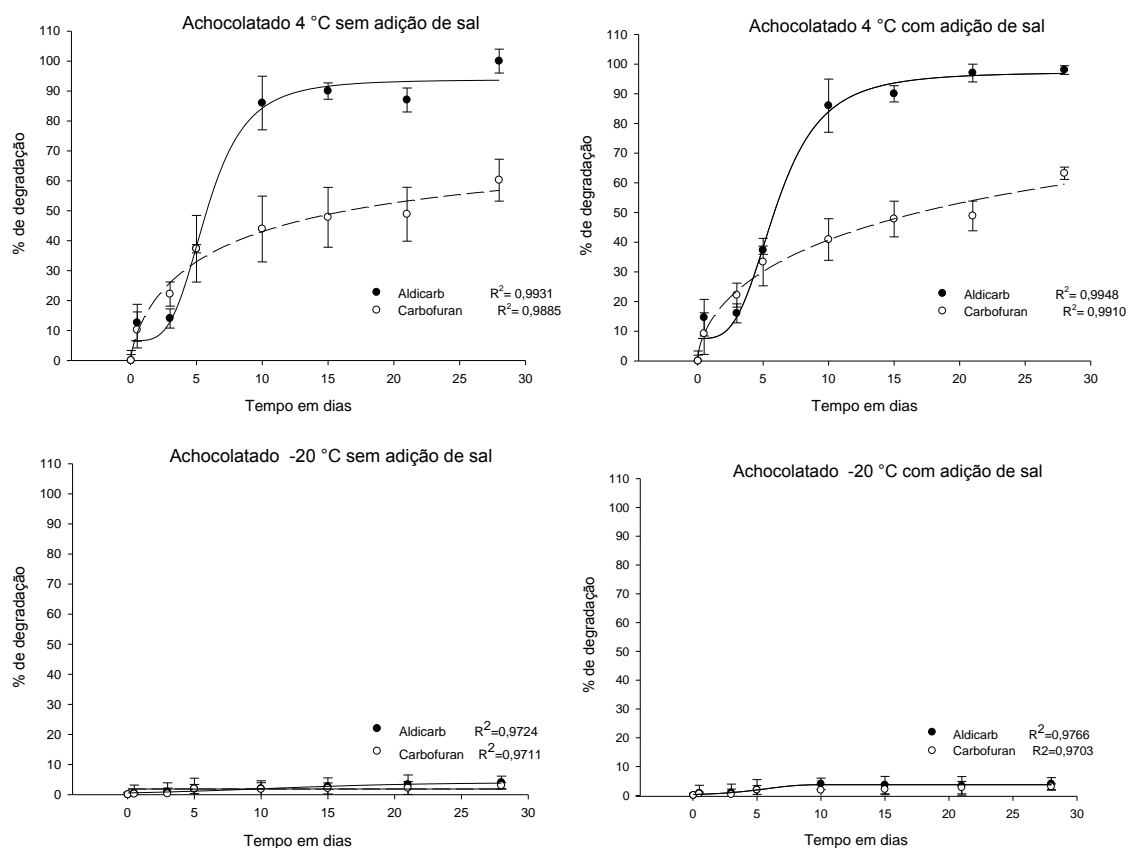
**Figura 4.9:** Efeito da luz e da adição de sal na estabilidade dos carbamatos em amostras de achocolatado armazenadas a 22 °C.

**Tabela 4.3:** Equações não lineares dos experimentos de degradação dos carbamatos em achocolatado

	<b>Aldicarb</b>	<b>Carbofuran</b>
ACH* sem luz e sem AD**	$y=100,4214 / (1+e^{-(x-4,1997)/1,2964})$	$y = 66,3076.e^{-e^{-(x-2,8631)/56296}}$
ACH com luz e sem AD	$y= 101,5212/ (1+e^{-(x- 2,6453)/ 1,0639})$	$y= 98,6105 / (1+e^{-(x-5,3227)/2,3372})$
ACH sem luz e com AD	$y=9,3238 + 90,6972/(1+e^{-(x-4,2407)/ 0,6968})$	$y = 69,4459.e^{-e^{-(x-1,9108)/1,8592}}$
ACH com luz e com AD	$y= 0,6348 + 107,8428.x^{1,1165}/(1,6447^{1,1165} + x^{1,1165})$	$y= 9,1805 + 92,9575.x^{2,5432}/(5,7495^{1,1165} + x^{2,5432})$
ACH 4 °C sem AD	$y=6,5999+87,2115.x^{3,8489} / (5,8009^{3,8489} + x^{3,8489})$	$y=78,6693 / (1+(x/7,7499)^{-0,7434})$
ACH 4 °C com AD	$y= 7,5799+89,7332.x^{3,4612}/(6,0396^{3,4612} + x^{3,4612})$	$y= 127,0498/ (1+(x/ 34,4136)^{-0,6062})$
ACH -20 °C sem AD	$y=\ln(-1,0244+1,1985x)$	$y=\ln(0,9256+0,5164x)$
ACH-20 °C com AD	$y=\ln(-1,3057+1,2746x)$	$y=\ln(-0,3732+0,7253x)$

\*ACH= achocolatado      \*\*AD=Adição de sal.

Na Figura 4.10 são mostrados o efeito da temperatura e da adição de sal na estabilidade dos carbamatos em achocolatado armazenado a 4 °C e -20 °C. Para as amostras armazenadas a 4 °C, a redução verificada para aldicarb e carbofuran 28 dias após a fortificação foi de aproximadamente 90% e 60% respectivamente. Verifica-se que a adição de sal não afeta a estabilidade desses princípios ativos. A -20 °C ocorre uma pequena degradação de aproximadamente 4% para os dois carbamatos estudados até 28 dias do experimento.



**Figura 4.10:** Efeito da temperatura e da adição de sal na estabilidade de Aldicarb e Carbofuran em amostras de achocolatado armazenadas a 4 °C e a -20 °C.

A alta degradação dos compostos em achocolatado armazenado à 22 °C e a 4 °C pode ser explicada pela característica dessa matriz, rica em proteínas, carboidratos e lipídeos, o que favorece o crescimento microbiano. O aparecimento de fungos foi verificado logo nos primeiros 5 dias, principalmente à temperatura de 22 °C.

O pH inicial do achocolatado foi 6,8. Após 5, 15 e 28 dias, os valores de pH foram 4,2; 6,5 e 8 respectivamente, a 22 °C. O abaixamento do pH se deve provavelmente à acidificação do meio em função de crescimento bacteriano e posteriormente, com a proteólise, ocorreu um aumento do pH do meio. Os valores de pH a 4 °C foram 6; 7 e 7,3 após 5, 15 e 28 dias respectivamente.

Na presença de microrganismos, a degradação do Aldicarb ocorre por duas rotas; oxidação do Aldicarb a Aldicarb sulfóxido e mais tarde a Aldicarb sulfona (em condições aeróbicas) e hidrólise do Aldicarb e de seus resíduos para oximas (em condições anaeróbicas) [25]. Estudos em solo mostraram que

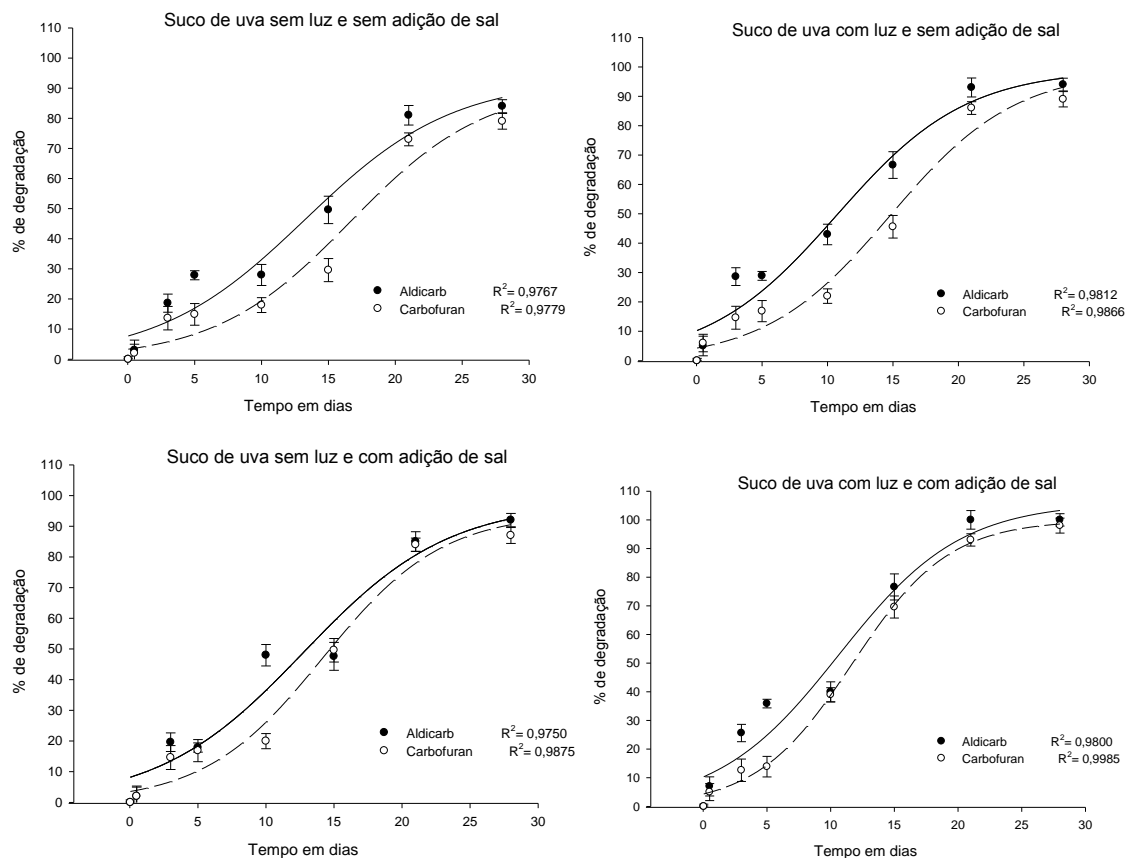
a degradação do aldicarb foi maior na camada superficial, onde a atividade microbiana exerceu maior ação sobre a degradação [26].

A degradação microbiana do carbofuran leva a formação do carbofuran-7-fenol. Esse composto pode ser degradado no solo e na água por hidrólise e fotólise e muitas bactérias capazes de degradá-lo têm sido isoladas e caracterizadas [27].

#### 4.3.5 Estabilidade dos carbamatos em suco de uva

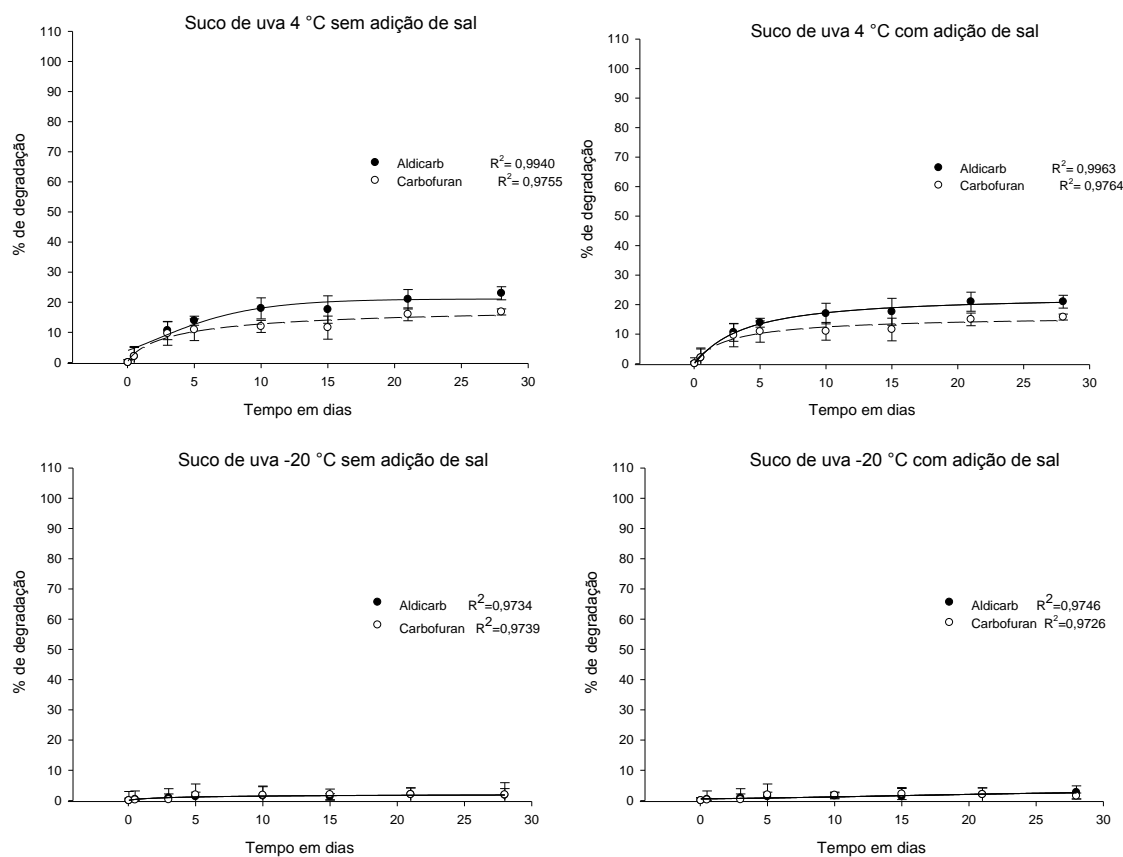
A estabilidade dos carbamatos em suco de uva armazenado a 22 °C na presença e ausência de luz e adição de sal é apresentada na figura 4.11. Verifica-se que nos primeiros dias a degradação do aldicarb e carbofuran em suco de uva é mais lenta à 22 °C se comparada ao achocolatado (Figura 4.10). O pH inicial do suco foi 3. Após 5, 15 e 28 dias, os valores de pH foram 2,9; 3 e 3,1 respectivamente, a 22 °C e a 4 °C. A degradação mais lenta se comparada ao achocolatado nos primeiros dias, se deve ao pH da matriz, uma vez que os carbamatos são mais estáveis em meio ácido [10,12]. Entretanto, após 21 dias a degradação na presença de luz chegou a 100 e 90% para o aldicarb e carbofurano, respectivamente. A presença de luz aumentou aproximadamente 15% a degradação dos compostos se comparado ao mesmo tratamento na ausência de luz no decorrer do experimento.

A adição de sal na concentração avaliada (1,5% de NaCl), não influenciou na degradação dos carbamatos em suco, independente da presença ou ausência da luz.



**Figura 4.11:** Efeito da luz e da adição de sal na estabilidade dos carbamatos em amostras de suco de uva armazenadas a 22 °C.

O efeito da temperatura e da adição de sal em amostras de uva armazenadas a 4 °C e -20 °C é apresentado na Figura 4.12. A redução verificada para Aldicarb e Carbofuran 28 dias após a fortificação foi de aproximadamente 20% e 15% respectivamente, para as amostras armazenadas a 4 °C. Essa degradação inferior em suco se comparada aos mesmos compostos em achocolatado armazenados à 4 °C se deve à menor degradação microbiana, uma vez que o pH do suco não favorece crescimento bacteriano e também à maior estabilidade dos carbamatos nesse pH. Foi observado que a adição de sal não afeta a estabilidade desses princípios ativos. A -20 °C ocorre uma degradação de aproximadamente 2% para os dois carbamatos estudados, indicando que esta é a temperatura ideal para armazenar este tipo de amostra.



**Figura 4.12:** Efeito da temperatura e da adição de sal na estabilidade de Aldicarb e Carbofuran em amostras de suco de uva armazenadas a 4 °C e a -20 °C.

Desses estudos foram ajustadas equações matemáticas para descrever os fenômenos. Na Tabela 4.4 estão apresentadas para cada carbamato e cada condição as equações ajustadas.

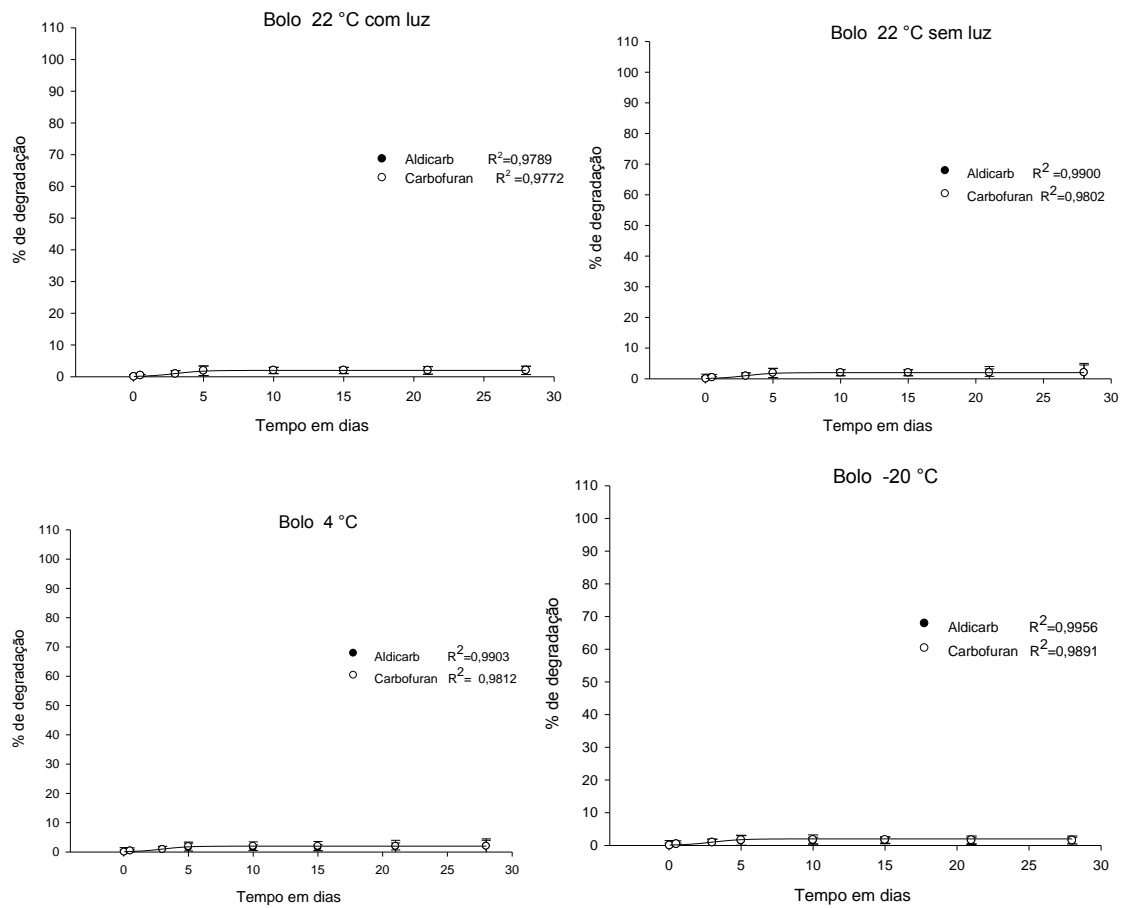
**Tabela 4.4:** Equações não lineares ajustadas para a degradação do aldicarb e carbofuran em suco de uva

	Aldicarb	Carbofuran
SU* sem luz e sem AD**	$y=92,8910/(1+e^{(-x-13,2689)/5,5135})$	$y= 91,2148/(1+e^{(-x- 16,6272)/5,0658})$
SU com luz e sem AD	$y= 99,0957/(1+e^{(-x- 10,7075)/4,9420})$	$y= 98,9400/(1+e^{(-x- 14,8024)/4,7717})$
SU sem luz e com AD	$y= 97,7449/(1+e^{(-x- 12,7577)/5,3262})$	$y= 94,3758/(1+e^{(-x- 14,2030)/4,3738})$
SU com luz e com AD	$y= 106,0317/(1+e^{(-x- 10,6616)/4,7800})$	$y= 99,8901/(1+e^{(-x- 11,7198)/3,7840})$
SU 4 °C sem AD	$y= 25,5866/(1+ (x/4,5123)^{-0,9837})$	$y= 19,0541/(1+ (x/ 4,1288)^{-0,8100})$
SU 4 °C sem AD	$y= 23,1628/(1+ (x/ 3,6754)^{-1,0697})$	$y= 16,5503/(1+ (x/ 2,9110)^{-0,8978})$
SU -20 °C sem AD	$y=\ln(1,2578+0,2853x)$	$y=\ln(1,0391+ 0,3868x)$
SU -20 °C com AD	$y=\ln(1,1804+0,3376x)$	$y=\ln(1,1604+0,3296x)$

\*SU= Suco de uva      \*\*AD=adição de sal

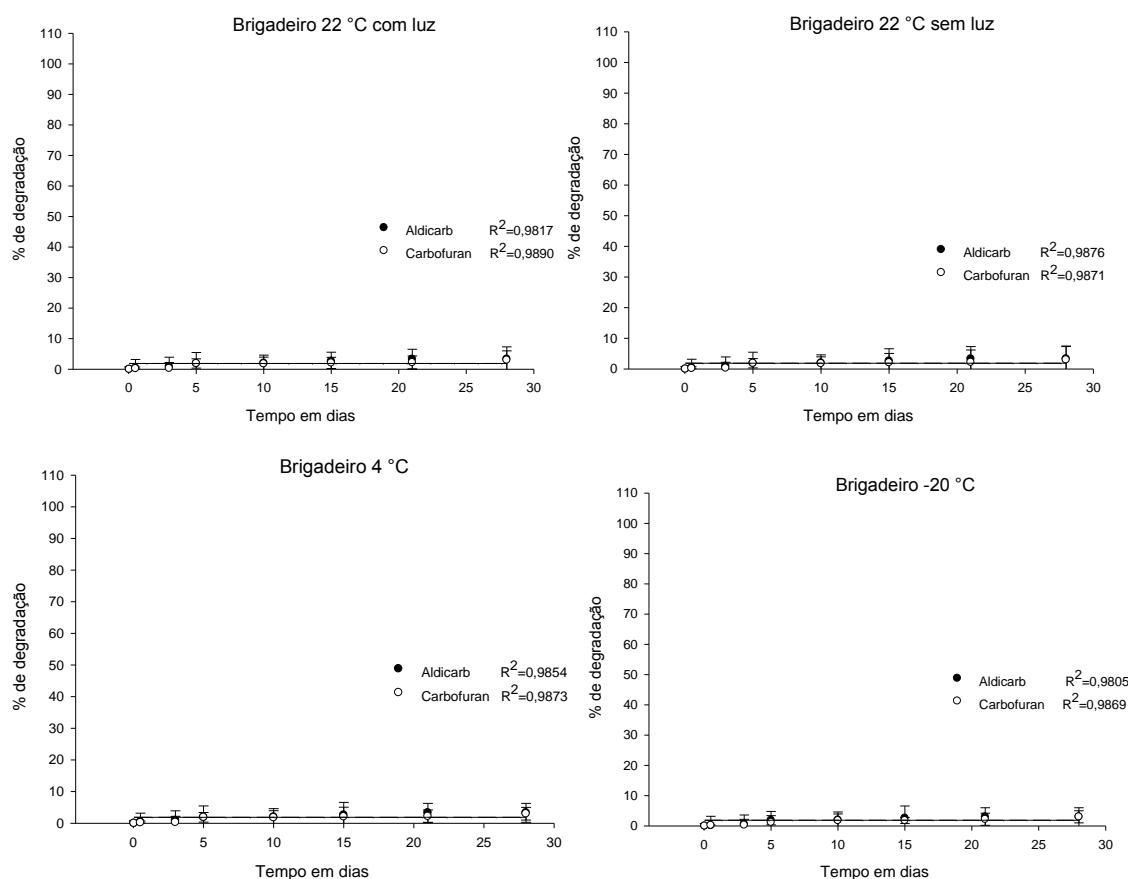
#### 4.3.6 Estabilidade dos carbamatos em bolo e brigadeiro

A degradação de aldicarb e carbofuran em bolo e brigadeiro foi verificada na ausência e presença de luz a 22 °C e em duas temperaturas (4 e -20 °C) e os resultados são apresentados nas Figuras 4.13 e 4.14. Desses dados foram ajustadas equações matemáticas para descrever os fenômenos. Na Tabela 4.5 estão apresentadas para cada carbamato e cada condição as equações ajustadas.



**Figura 4.13:** Efeito da luz e da temperatura na estabilidade de carbamatos em amostras de bolo armazenadas a 22 °C, 4 °C e -20 °C.





**Figura 4.14:** Efeito da luz e da temperatura na estabilidade de carbamatos em amostras de brigadeiro armazenadas a 22 °C, 4 °C e -20 °C.

**Tabela 4.5:** Equações não lineares dos experimentos de degradação dos carbamatos em bolo e brigadeiro

	Aldicarb	Carbofuran
Bolo 22 °C		
com luz	$y=\ln(-1,3057+1,2746x)$	$y=\ln(0,9256+0,5164x)$
Bolo 22 °C		
sem luz	$y=2,0066/1+e^{-(x-2,9983)/1,0368)}$	$y=2,0019/1+e^{-(x-2,99233)/1,0339)}$
Bolo 4 °C		
	$y=2,0059/(1+e^{-(x-2,9883)/1,0767})$	$y=2,005/(1+e^{-(x-2,79289)/1,0895})$
Bolo -20 °C		
	$y=2,005/(1+e^{-(x-2,9569)/1,0347})$	$y=2,000/(1+e^{-(x-2,6125)/1,0683})$
BRI*22 °C		
com luz	$y=\ln(3,0289+0,8718x)$	$y=\ln(3,1205+0,9346x)$
BRI 22 °C		
sem luz	$y=\ln(3,1200+0,8890x)$	$y=\ln(3,7350+0,8957x)$
BRI 4 °C s		
	$y=\ln(3,0002+0,5718x)$	$y=\ln(2,9539 +0,7604x)$
BRI -20 °C		
	$y=\ln(2,9909+0,7718x)$	$y=\ln(3,0405+0,6584x)$

\*BRI=brigadeiro

Observa-se que a degradação foi mínima (3% aproximadamente para o aldicarb e carbofuran) em todos os tratamentos nas duas matrizes estudadas. Essas matrizes sólidas não apresentam condições favoráveis de umidade para crescimento bacteriano, além disso, por serem sólidas, os processos de hidrólise são dificultados. São alimentos muito açucarados, desfavorecendo o crescimento microbiano e conseqüentemente a degradação microbiana dos agrotóxicos presentes nessas matrizes. Os valores de pH do bolo e brigadeiro foram 7,5 e 6,47 respectivamente, se mantendo durante os 28 dias do experimento. O pH foi medido através do preparo de uma solução de bolo ou brigadeiro a 10 % em água destilada, previamente fervida. A solução foi agitada em mesa agitadora por 30 minutos. Decantou-se por 10 minutos e mediu-se o pH do sobrenadante. O aparecimento de mofos nas duas matrizes foi lento, perceptível após 21 dias apenas no armazenamento a 22 °C.

#### **4.4 CONCLUSÃO**

Os estudos de estabilidade de aldicarb e carbofuran em água mostram que a luz, o pH e a temperatura afetam a estabilidade dos carbamatos e que a adição de sal empregada nesse estudo não interfere nessa estabilidade. Em meio alcalino esses compostos são mais instáveis do que em meio ácido. Portanto, amostras de água contaminadas com carbamatos devem ser armazenadas até o momento da análise em freezer, ao abrigo de luz e em pH próximos de 4.

A incidência de luz, a composição da matriz e a temperatura afetam a estabilidade dos carbamatos em amostras de achocolatados e suco de uva. A melhor forma de armazenamento para amostras de bebidas até o momento da análise é em freezer a -20 °C e ao abrigo da luz. Nas matrizes sólidas de bolo e brigadeiro a estabilidade dos compostos não foi afetada significativamente por nenhum dos fatores avaliados.

## 4.5 REFERÊNCIAS

- [1] WHO. Environmental Health Criteria. Who Technical Report Series, N. 53, (1989). <[http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest53\\_e.htm](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest53_e.htm)>
- [2] N. Bertrand, D. Barceló, Anal. Chim. Acta 254 (1991) 235-244.
- [3] P. H. Howard, Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals: pesticides. Chelsea: Lewis Publishers, 1991.
- [4] OREGON STATE UNIVERSITY. EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK. EXTOXNET. Pesticide information profiles: Oxamyl. Corvallis. <<http://ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/oxamyl.htm>>.
- [5] OREGON STATE UNIVERSITY. EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK - EXTOXNET. Pesticide information profiles: Propoxur. Corvallis. <<http://ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/Propoxur.htm>>
- [6] C. R. Soccol, L. I. Pinheiro, A.A.W. Krefta, Pesticidas: R. Técnico-científica, 5 (1995)1-18.
- [7] N. N. Mel'nikov, R. Chemical-Reviews 61(1992) 1932-1966.
- [8] G. S.Nunes, R. M Alonso, M. L.Ribeiro, D.Barceló, J. of Chromat. A 888 (2000) 113-120.
- [9] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Aldicarb in Drinking-water. WHO Guidelines for drinking-water quality, 14p., 2003. <<http://www.inchem.org/documents>>
- [10] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Carbofuran. In: Pesticides, p. 3-9, s.d. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents>>
- [11] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Carbamate pesticide: a general introduction. Gêneva, 1986. 137p. (Environmental Health Criteria 64).
- [12] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Aldicarb. Gêneva, 1991. p. 52-74. (Environmental Health Criteria 121).
- [13] E. Lacassie, P. Marquet, J. M, Gaulier, M. F. Dreyfuss, G. Lachatre, For. Sci. Int.121 (2001) 116-125.
- [14] S. M. Goulart, R.D. Alves, A. A. Neves, J. H. Queiroz, T. C. Assis, M. E. L. R. Queiroz, Anal. Chim. Acta 671 (2010) 41–47.
- [15] S. M. Goulart, M. E. L. R. Queiroz, A. A. Neves, J. H. Queiroz, Talanta 75/5 (2008) 1320-1323.

- [16] G. P. Pinho, A. A. Neves, M. E. L. R. Queiroz, F. O. Silvério, *Food Chem.* 121 (2010) 251–256.
- [17] G. P. Pinho, A. A. Neves, M. E. L. R. Queiroz, F. O. Silvério, *Food Control.* 21 (2010) 1307–1311.
- [18] D. M Trotter, R.A.Kent, M.P. Wong, *Rev. Environ. Control.* 21(1991) 137-176.
- [19] C.D.S. Tomlin, *The pesticide manual.* 12.ed. Farnham: The British Crop Protection Council, 2000.
- [20] N. Bertrand, D. Barceló. *Anal. Chim. Acta* 254 (1991), 235-244.
- [21] J. Bachman, H. H. Patterson. *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999), 874–881.
- [22] M. Mahalakshmi, B. Arabindoo, M. Palanichamy, V. Murugesan, *J. of Hazard Materials* 143 (2007) 240-245.
- [23] M. R. S. Moreira, J. L. N. Mucci, R. B. Abakerli, *Arq. Inst. Biol.* 71 (2004) 221-226.
- [24] R. D. Alves, *Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2010.*
- [25] L. H. S. Damasceno, M. A. T. Adorno, J. S. Hirasawa, M.B. A Varesche, M. Zaiat. *J. Braz. Chem. Soc.* 19, (2008) 1158-1164.
- [26] N. R. A.Castro, R. L. O. Rigitano, J. M. Lima, C, J. Bastos. *Pesq. Agrop. Bras. Brasília* 40 (2005) 803-809.
- [27] N. Bano, J. Musarrat, *Microbiol. Letters* 231(2004) 13-17.

## **CAPÍTULO 5**

### **AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ NA ANÁLISE DE CARBAMATOS EM ALIMENTOS E BEBIDAS POR CLAE-UV**

#### **5.1 INTRODUÇÃO**

Os carbamatos são agrotóxicos que contribuem para a melhoria da qualidade dos alimentos e o aumento da produção agrícola. Entretanto, o uso inadequado e excessivo pode levar a contaminação do ambiente, além de deixar resíduos nos alimentos levando a intoxicações humanas e animais. Os principais carbamatos envolvidos em casos de intoxicações acidentais ou intencionais são o aldicarb e o carbofuran [1].

Em 2009, o Brasil utilizou mais de 1 bilhão de litros de agrotóxicos. Esse consumo dobrou nos últimos 10 anos, conferindo ao país a posição de maior consumidor mundial de agrotóxicos [2]. O aldicarb é comumente usado em todo território nacional sendo atualmente, o maior responsável pelas mortes por

intoxicações agudas acidentais, suicidas e homicidas no estado de Minas Gerais. Em algumas formulações esse princípio ativo está associado ao carbofuran [3].

Esses fatos motivam a pesquisa de metodologias analíticas que permitam avaliar de forma segura e rápida a contaminação dos alimentos, proporcionando condições para que tomadas de decisões criminais e de fiscalização sejam efetuadas.

A aplicação de um método analítico envolve um processo de avaliação que ateste a sua eficiência em usos em rotina, denominado validação [4]. O efeito de matriz é um parâmetro de validação que tem por objetivo avaliar se os componentes da matriz interferem no sinal do analito [3]. Estas interferências podem aumentar a resposta do equipamento para o analito ou diminuí-la [5,6].

Trabalhos publicados recentemente demonstraram efeito de matriz na determinação de resíduos de agrotóxicos por cromatografia gasosa [6] e cromatografia líquida de alta eficiência com detector espectrométrico de massas [5,7,8]. O efeito de matriz utilizando o detector espectrométrico de massas é devido à competição dos componentes da matriz 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 [5]. Esses efeitos são observados principalmente em matrizes mais complexas como matrizes biológicas, alimentos e bebidas. O mecanismo do efeito de matriz na cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV) é pouco conhecido e não existem muitos relatos na literatura sobre o assunto [9,10].

Para verificação do efeito de matriz, recomenda-se preparar uma curva analítica na matriz original e sobre uma matriz de solvente, para posterior análise do coeficiente angular e linear das duas retas [3]. Tratamentos matemáticos das curvas analíticas na determinação de antibióticos em material biológico foram sugeridos por Steliopoulos (2010) [11].

Vários trabalhos [12-16] envolvendo análise de agrotóxicos em alimentos têm demonstrado que extratos de amostras complexas contêm, além dos analitos de interesse, componentes da matriz que não são considerados como interferentes do analito, mas alteram a resposta cromatográfica dos mesmos,

principalmente quando a análise instrumental é realizada por cromatografia gasosa [6].

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de matriz na análise de amostras de água mineral, achocolatado, suco de uva, bolo e brigadeiro na resposta cromatográfica de três carbamatos, aldicarb, carbofuran e carbaryl, analisados por CLAE-UV.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1 Equipamentos

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido Shimadzu LC 20AT equipado com um detector UV/VIS Shimadzu SPD 20A, forno da coluna, Shimadzu CTO 10ASVP, injetor automático Shimadzu SIL 10AF; sistema de integração Lab Solutions da Shimadzu; Banho ultra-sônico Maxi Clean 750- Unique (saída de 150 W e frequência de 33 kHz); mesa agitadora (Tecnal TE – 420, São Paulo, Brasil) a 25 °C e 175 oscilações por minuto; e vortex (Certomat® MV).

### 5.2.2 Condições cromatográficas

As seguintes condições cromatográficas foram ajustadas para determinação simultânea de aldicarb, carbofuran e carbaryl por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência): Coluna Phenomenex Luna 3µm C18, 100 A 150 x 4,6 mm; fase móvel: água purificada: acetonitrila 65:35 v:v, vazão da fase móvel: 0,8 mL min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna: 35 °C e volume de injeção 20 µL. Detector de UV (λ: 195 nm-aldicarb e carbofuran e 213 nm - carbaryl).

### 5.2.3 Reagentes e soluções

As soluções padrão estoque na concentração de 1000,0 mg L<sup>-1</sup> de aldicarb, carbofuran e carbaryl foram preparadas individualmente em acetonitrila (J.T. Baker, grau HPLC) e armazenadas em freezer. A partir de diluição das soluções estoque foi preparada uma solução padrão de trabalho contendo os três carbamatos na concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup>.

As soluções empregadas foram preparadas a partir de padrões de aldicarb (99,9% m/m – Sigma Aldrich), carbaryl (99,8% m/m – Sigma Aldrich), carbofuran (99,9% m/m – Sigma Aldrich), utilizando como solvente acetonitrila (J.T. Baker/ HPLC). A acetonitrila também foi empregada como solvente extrator.

#### 5.2.4 Preparo dos extratos orgânicos das amostras por extração líquido-líquido ou extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT ou ESL-PBT)

Extratos orgânicos de amostras de água mineral, achocolatado, suco de uva, bolo e brigadeiro foram obtidos a partir das técnicas de ESL-PBT e ELL-PBT [12-16]. Para isso, uma determinada quantidade da amostra (Tabela 5.1) foi transferida para frasco de vidro transparente (22 mL) e, em seguida, foram adicionado 2,00 mL de acetonitrila. Para as amostras sólidas foram adicionados 2,00 mL de água antes da adição do solvente. A adição de sal (NaCl 1,5%) foi necessária para água e suco de uva, sendo realizada antes da adição do solvente orgânico (Tabela 5.1). O sistema foi submetido a homogeneização (Tabela 5.1) e resfriado em freezer a -20 °C por 3 horas para separação das fases. Após este período, 1 mL da fase orgânica foi transferido para frascos com capacidade de 2,0 mL (vials do injetor automático do cromatógrafo). Os extratos foram armazenados no freezer, até o momento da análise por CLAE-UV. Na Tabela 5.1 são descritas as condições específicas para o preparo de cada amostra.

**Tabela 5.1.** Descrição do preparo dos extratos das matrizes empregando a ELL-PBT ou ESL-PBT: quantidade de amostra, adição de NaCl, forma e tempo de homogeneização

Nº	Matriz	Quant.	NaCl	Homogeneização
1	Água mineral	2,00 mL	1,5% m/v	Ultrassom (10 min.)
2	Achocolatado	2,00 mL	0,0% m/v	Vórtex (60 seg.)
3	Suco de uva	2,00 mL	1,5% m/v	Vórtex (60 seg.)
4	Bolo	1,0000 g	0,0% m/v	Mesa agitadora (5 min.)
5	Brigadeiro	1,0000 g	0,0% m/v	Mesa agitadora (5 min.)



### 5.2.5 Curvas analíticas e seletividade

Para verificação do possível efeito de coextrativos da matriz na resposta cromatográfica, foram construídas curvas analíticas preparadas em solvente e no branco de cada matriz. Soluções-padrão contendo os três carbamatos nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas em acetonitrila.

As curvas no branco da matriz foram construídas pela injeção de padrões preparados em extratos orgânicos obtidos das matrizes (água mineral, achocolatado, suco de uva, bolo e brigadeiro). Os brancos foram obtidos a partir da ESL-PBT ou ELL-PBT de amostras isentas de resíduos de agrotóxicos. Os extratos dos brancos de cada matriz foram analisados previamente para avaliar a seletividade do método.

As concentrações das soluções padrão preparadas em triplicata para construção das curvas analíticas nos extratos (achocolatado, suco de uva, bolo e brigadeiro) foram de 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>. Em água mineral a maior concentração foi 2,0 mg L<sup>-1</sup>.

Após a análise das soluções padrão preparadas em acetonitrila e no extrato orgânico por CLAE-UV, as curvas analíticas foram construídas para cada matriz.

O efeito de matriz foi avaliado comparando os parâmetros (coeficiente angular e linear) das equações de reta obtidas pela regressão linear das curvas analíticas (em solvente e em extrato da matriz). A porcentagem do aumento ou diminuição da resposta do detector foi calculada pela média das áreas da solução padrão de cada agrotóxico preparada no extrato da matriz (em cada concentração) em relação à média das áreas da solução padrão de cada agrotóxico preparada em solvente.

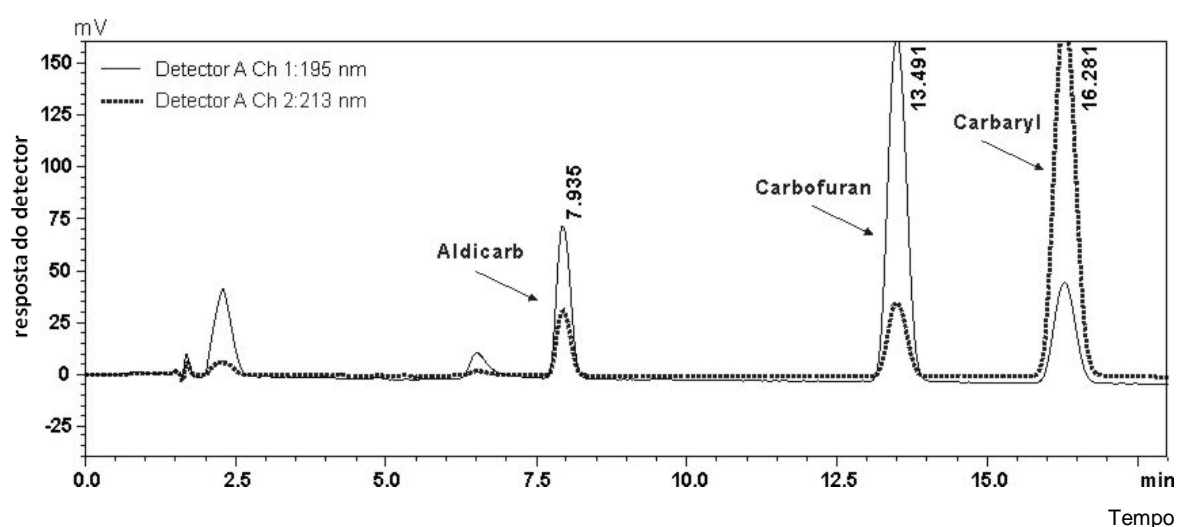
No tratamento estatístico da Linearidade das curvas analíticas, foi realizado o ajuste exploratório dos dados de cada curva pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) [17, 18]. Os valores dispersos foram confirmados e tratados pelo teste dos resíduos padronizados Jackknife, o qual foi aplicado sucessivamente até que novos valores dispersos não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2 % no número original de resultados [19, 20]. Para checar as violações das premissas relacionadas à

análise de regressão foram avaliadas, a normalidade pelo teste de Ryan & Joiner [21], a homoscedasticidade pelo teste de Levene modificado [22] e teste de Brown & Forsythe [23] e a independência dos resíduos da regressão pelo teste de Durbin & Watson [24]. Testes de F foram conduzidos para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação das significâncias da regressão e do desvio da linearidade [25].

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 Análise cromatográfica

As condições cromatográficas otimizadas para análise simultânea dos carbamatos permitiram uma boa separação dos princípios ativos conforme o cromatograma apresentado na Figura 5.1.



**Figura 5.1.** Cromatograma de uma solução padrão a  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  de aldicarb ( $t_R = 7,935 \text{ min}$ ), carbofuran ( $t_R = 13,491 \text{ min}$ ), e carbaryl ( $t_R = 16,281 \text{ min}$ ) em acetonitrila.

Os picos, com tempos de retenção ( $t_R$ ) iguais a 7,935; 13,491 e 16,281 min correspondem à aldicarb, carbofuran e carbaryl, respectivamente.

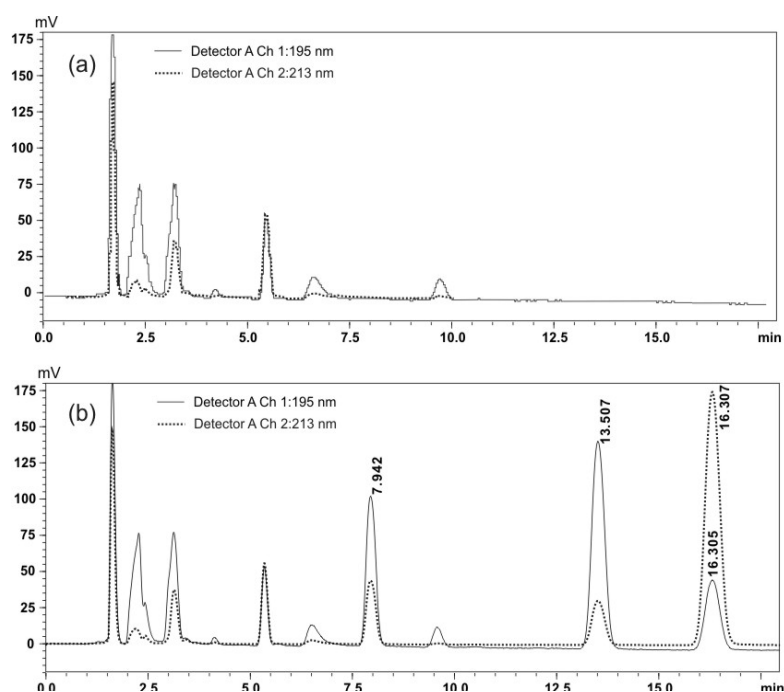
O detector ultravioleta foi selecionado para detecção simultânea dos carbamatos em dois comprimentos de onda ( $\lambda=195 \text{ nm}$  e  $213 \text{ nm}$ ). O

comprimento de onda de absorção para aldicarb e carbofuran foi de 195 nm e para carbaryl de 213 nm. Nestas condições, os carbamatos foram analisados em 18 minutos.

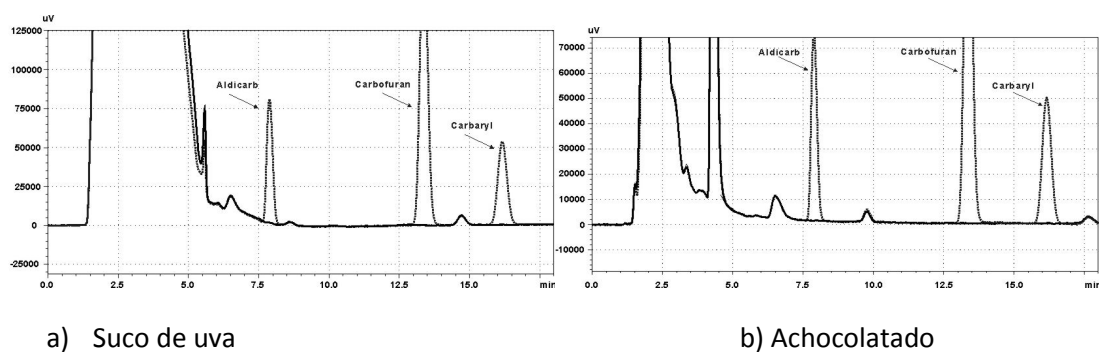
### 5.3.2 Curvas analíticas e seletividade

Curvas analíticas foram construídas para avaliar o efeito dos coextrativos na resposta dos agrotóxicos aldicarb, carbofuran e carbaryl em matrizes de alimentos e bebidas (água mineral, achocolatado, suco de uva, bolo e brigadeiro). Para isso, duas séries de soluções padrão (0,50 a 5,0 mg L<sup>-1</sup>) foram preparadas, sendo uma em solvente puro e outra em extrato de cada matriz isenta dos carbamatos em estudo.

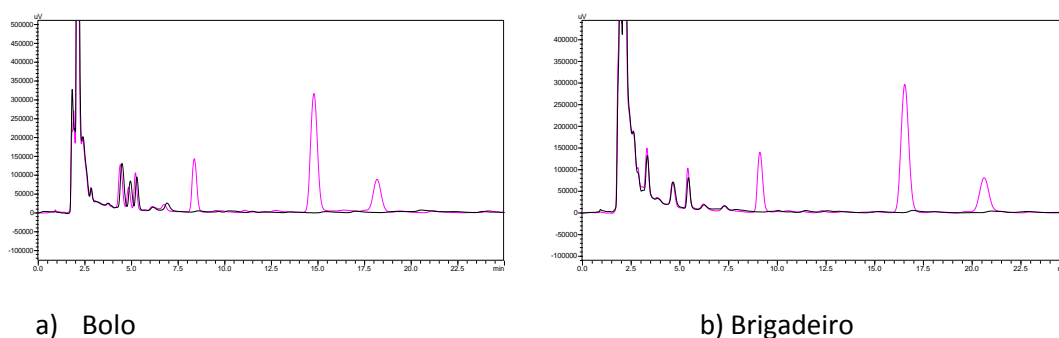
O extrato do branco foi analisado previamente para avaliar a seletividade do método, não sendo observado nenhum interferente no tempo de retenção dos carbamatos estudados. Nas figuras 5.2 a 5.4 estão apresentados os cromatogramas dos brancos de cada matriz e sua comparação com extratos fortificados.



**Figura 5.2:** (a) - Cromatograma de um extrato obtido de água mineral isenta dos princípios ativos e (b) - cromatograma de um extrato de água mineral contendo os carbamatos a 5,0 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura 5.3:** Cromatogramas de extratos obtidos de suco de uva (a) e achocolatado (b) isentas dos princípios ativos (\_\_\_) e cromatogramas de extratos de bebidas fortificadas com  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  dos carbamatos (----).



**Figura 5.4:** Cromatogramas de extratos de bolo (a) e brigadeiro (b) isento dos princípios ativos (\_\_\_) e cromatograma de extratos fortificadas com  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  dos carbamatos (\_\_\_).

Avalia-se o efeito de matriz comparando-se os valores dos coeficientes angulares e lineares obtidos de duas curvas analíticas (solvente e extrato de matriz). Quando somente o coeficiente angular varia os componentes da matriz contribuem para introduzir nos resultados um erro sistemático proporcional. Quando apenas o coeficiente linear varia, significa que existe um erro sistemático constante. Quando os dois coeficientes variam, têm-se os dois erros, sistemático constante e proporcional [5, 6].

A linearidade foi confirmada para todas as curvas preparadas nesse trabalho. Todos os valores dispersos identificados foram confirmados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, não sendo observadas tendências nos gráficos exploratórios dos resíduos das regressões, após o tratamento dos dados. A premissa de que os resíduos da regressão devem seguir a

distribuição normal foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner [21]. Os coeficientes de determinação obtidos foram superiores a 0,99. Estes resultados indicaram que o desvio da normalidade não foi significativo ( $p > 0,10$ ), permitindo o uso dos testes de hipóteses de t e F. A variabilidade dos resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração estudados foi constante, demonstrando homoscedasticidade. A estatística t de Levene não foi significativa ( $p > 0,05$ ) em todas as curvas examinadas. Independência dos resíduos da regressão foi evidenciada pelo teste de Durbin-Watson [24], uma vez que as distribuições dos pontos não apresentaram tendências positivas ou negativas. Assim, o uso do MMQO foi adequado para estimativa dos parâmetros das regressões.

A razão entre os coeficientes angulares (RCA) obtida entre as curvas analíticas em extrato da matriz e solvente e também a razão entre os coeficientes lineares (RCL) das curvas analíticas obtidas em extratos da matriz e em solvente são apresentadas na Tabela 5.2.

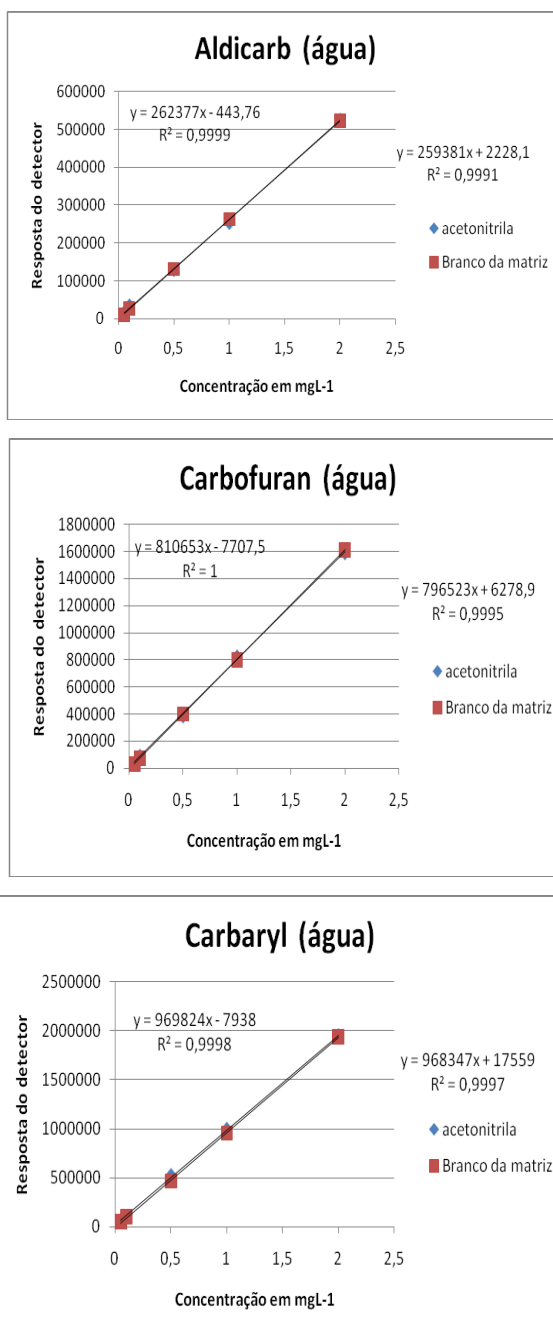
**Tabela 5.2.** Razão entre os coeficientes angulares (RCA) e lineares (RCL) das curvas analíticas obtidas em extratos da matriz e em solvente puro (matriz/solvente)

Amostra	Aldicarb		Carbofuran		Carbaryl	
	RCA	RCL	RCA	RCL	RCA	RCL
Água mineral	1,0	0,2	1,0	1,2	1,0	0,5
Achocolatado	1,0	3,1	1,0	2,0	1,0	0,01
Suco de uva	1,0	2,5	1,0	0,6	1,0	0,01
Bolo	1,0	0,9	1,0	1,1	1,0	1,0
Brigadeiro	1,0	0,7	1,0	0,06	1,0	1,0

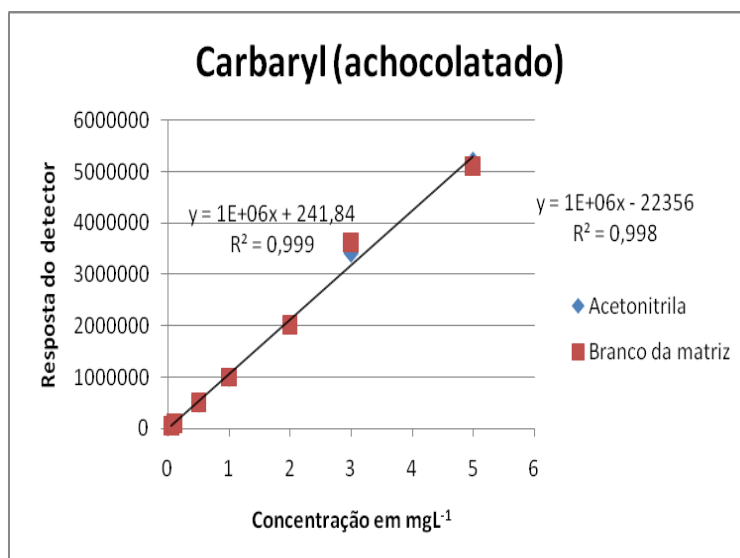
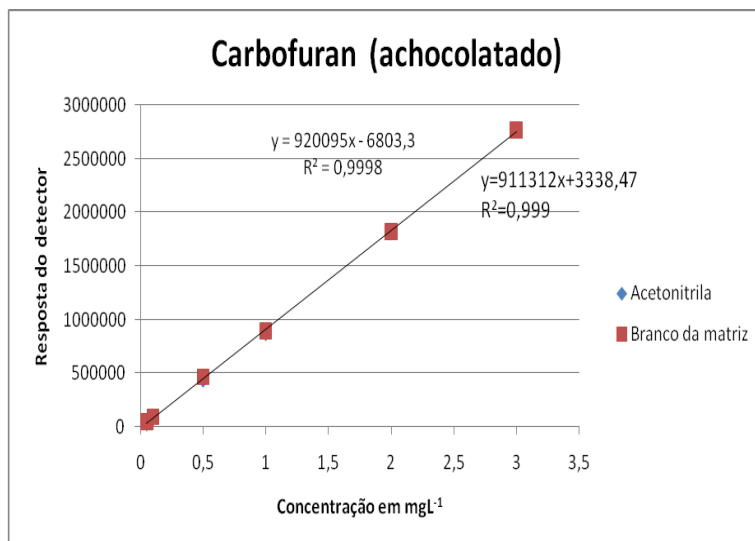
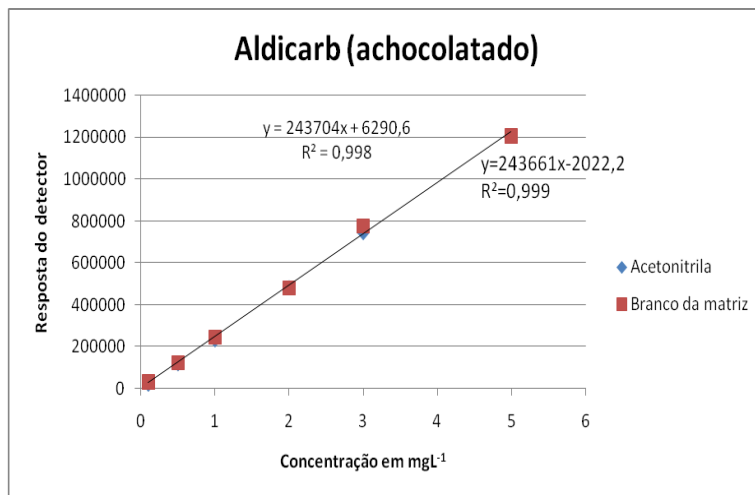
Verificou-se ausência de efeito de matriz na análise de aldicarb, carbofuran e carbaryl em todas as matrizes quando somente a razão entre os coeficientes angulares foi considerada. Poucos relatos foram encontrados na literatura sobre efeito de matriz por CLAE. Aragão et al (2009), na análise de cafeína, teobromina e teofilina em amostras de vários tipos de chás por CLAE-UV relata que nenhum efeito de matriz foi verificado, mas não comenta

detalhes da análise [9]. Trabalhos semelhantes em águas superficiais por cromatografia gasosa, também verificaram ausência de coextrativos na análise de piretróides em água [27].

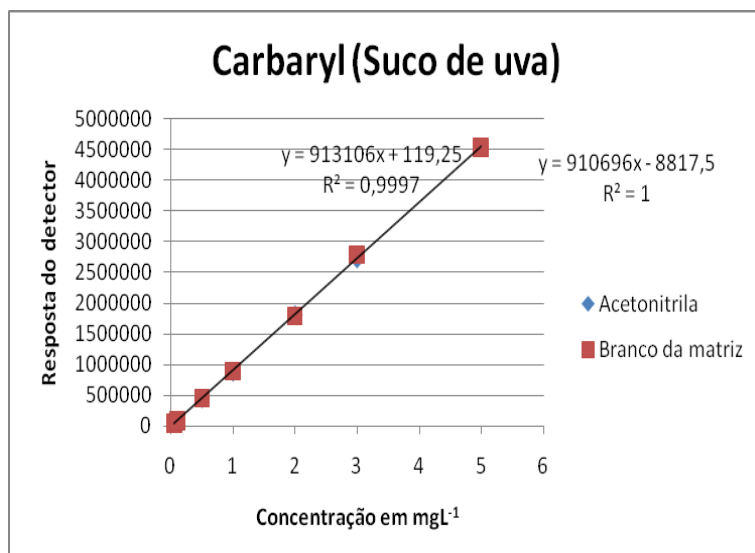
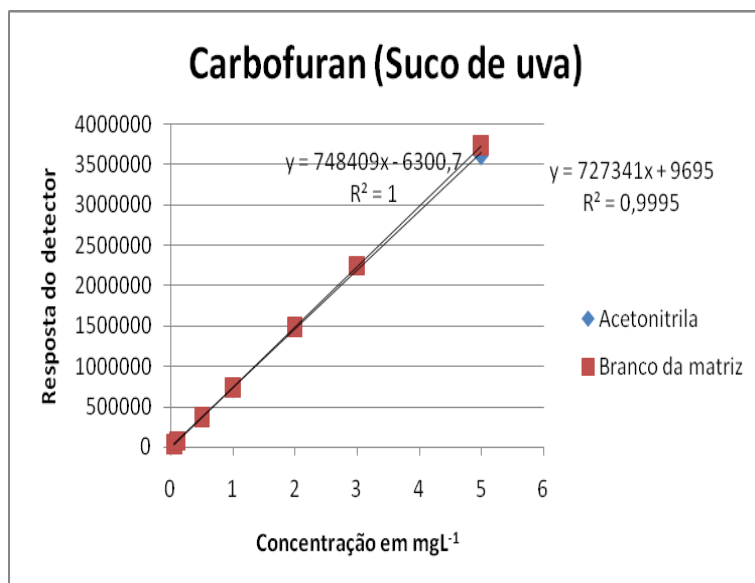
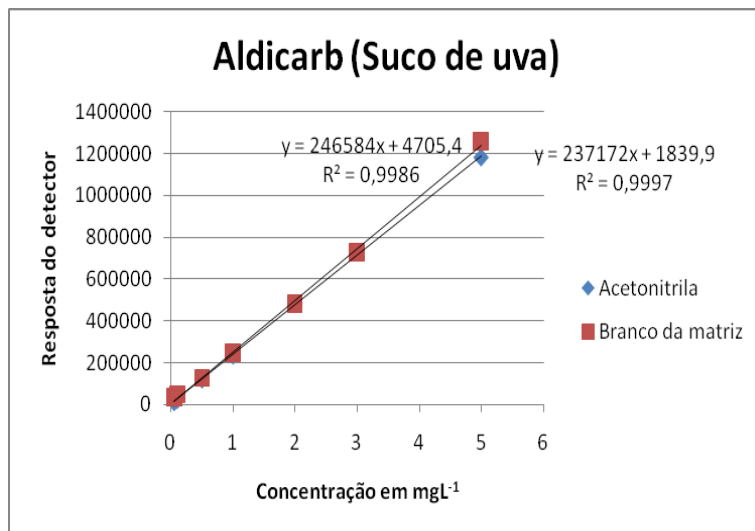
Nas Figuras 5.5 a 5.9 são apresentadas as curvas dos três carbamatos preparadas em solvente e no branco das matrizes água mineral, achocolatado, suco de uva, bolo e brigadeiro, respectivamente.



**Figura 5.5:** Curvas analíticas dos carbamatos (aldicarb, carbofuran e carbaryl) preparadas em solvente e no branco da matriz (água).

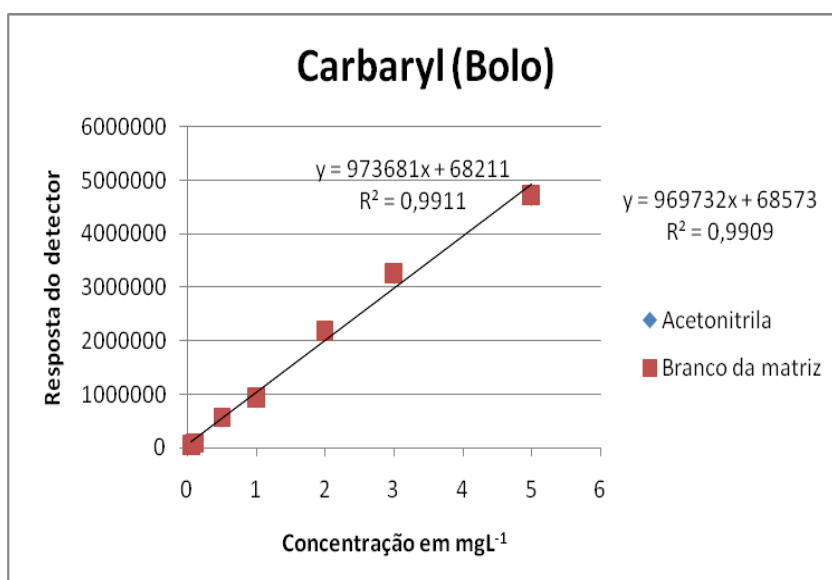
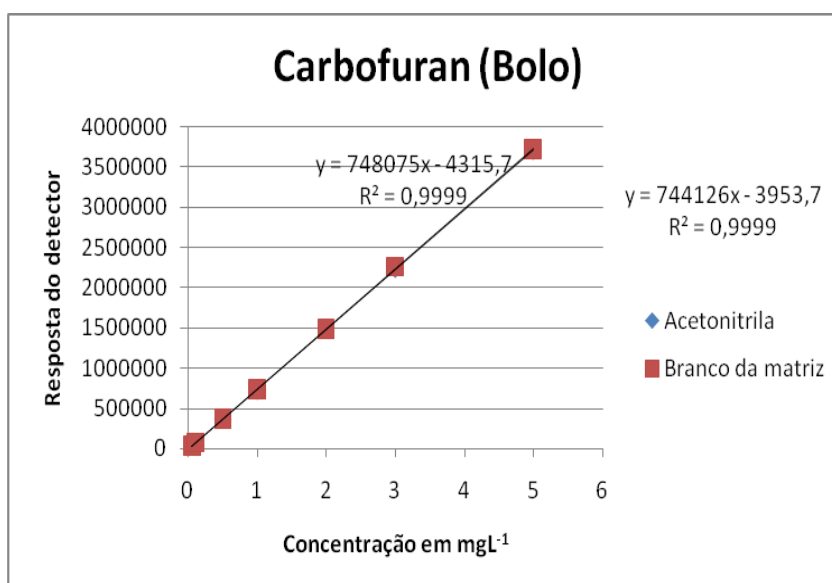
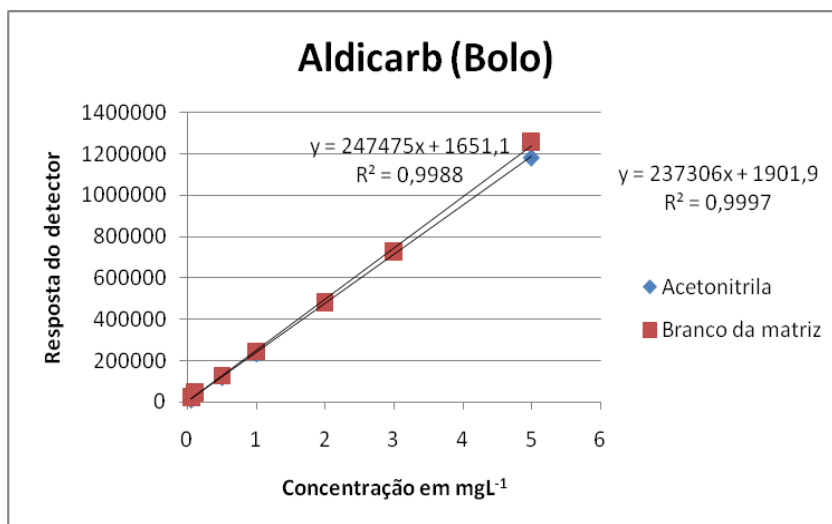


**Figura 5.6:** Curvas analíticas dos carbamatos (aldicarb, carbofuran e carbaryl) preparadas em solvente e no branco da matriz (achocolatado).

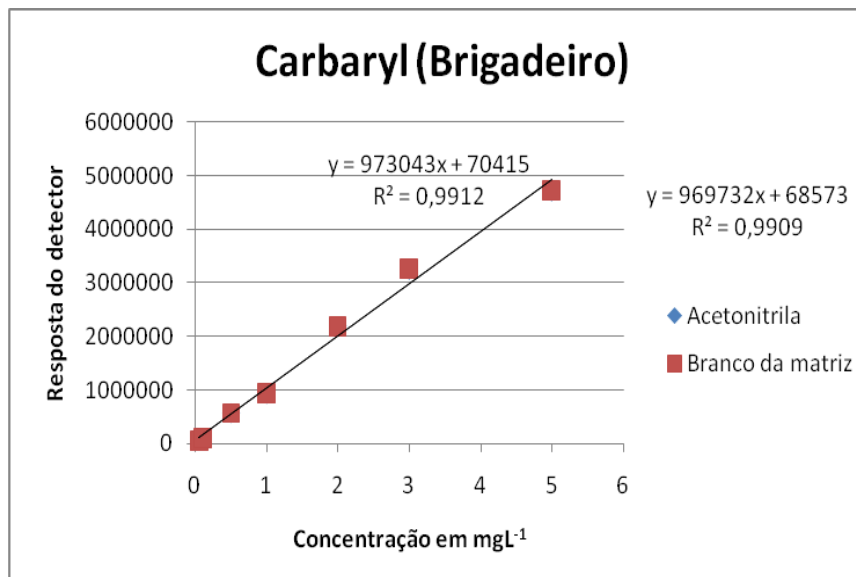
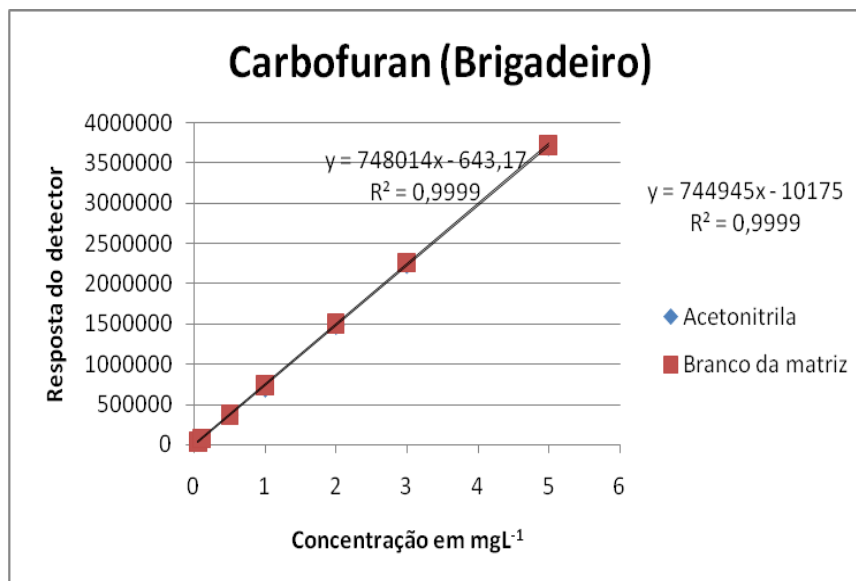
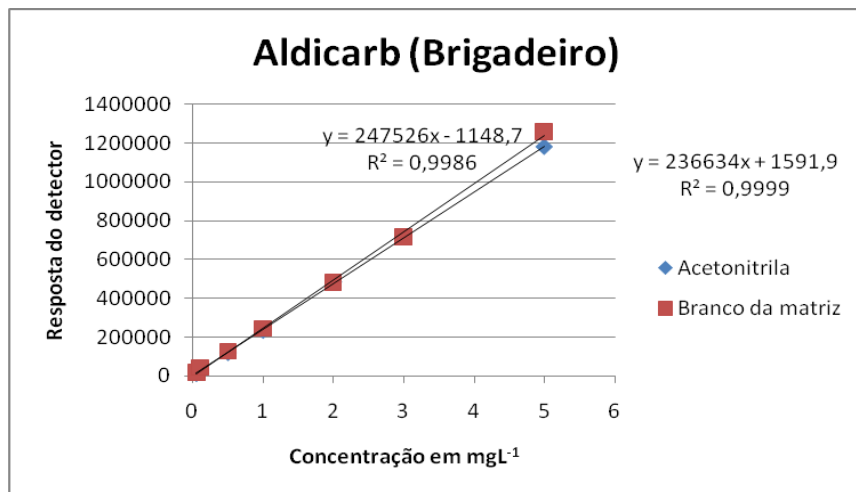


**Figura 5.7:** Curvas analíticas dos carbamatos (aldicarb, carbofuran e carbaryl) preparadas em solvente e no branco da matriz (suco de uva).





**Figura 5.8:** Curvas analíticas dos carbamatos (aldicarb, carbofuran e carbaryl) preparadas em solvente e no branco da matriz (bolo).

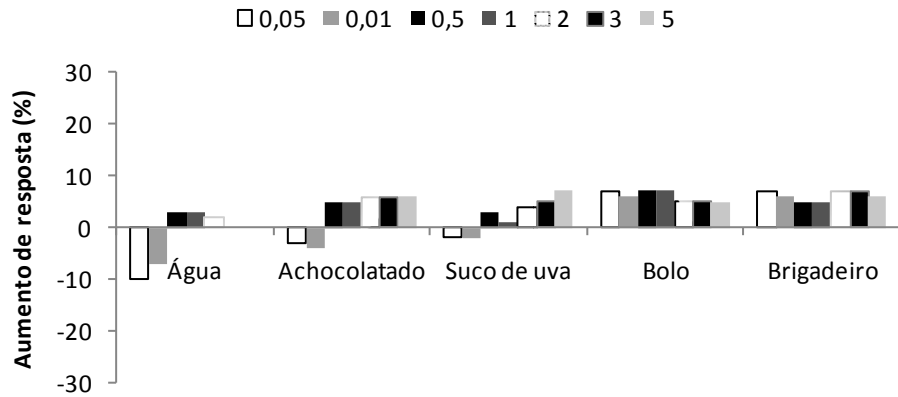


**Figura 5.9:** Curvas analíticas dos carbamatos (aldicarb, carbofuran e carbaryl) preparadas em solvente e no branco da matriz (brigadeiro).

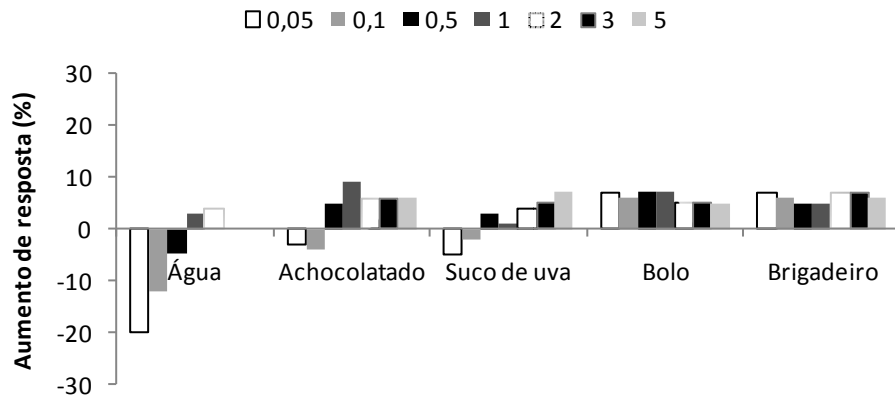
### 5.3.3 Variação da resposta cromatográfica nas diferentes matrizes

Outra forma de avaliar o efeito de matriz é calcular a porcentagem de variação na resposta cromatográfica para cada concentração do analito [5,6]. A porcentagem de variação da resposta cromatográfica para os três carbamatos em extratos das cinco matrizes foi determinada pela fórmula [% =  $(\bar{A}_{\text{matriz}} - \bar{A}_{\text{solvente}}) / \bar{A}_{\text{solvente}} \times 100$ ], em que  $\bar{A}$  corresponde à média da área. Os resultados são apresentados na Figura 5.10

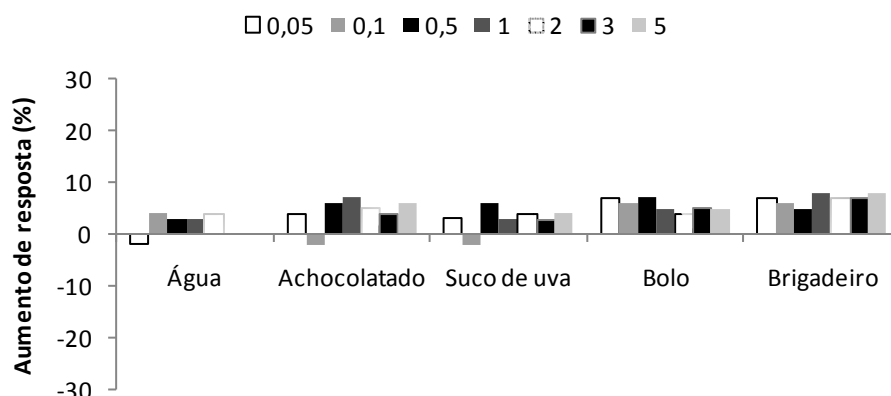
#### Aldicarb



#### Carbofuran



## Carbaryl



**Figura 5.10** Variação da resposta cromatográfica dos carbamatos aldicarb, carbofuran e carbaryl quando preparados em extratos (água mineral, achocolatado, suco de uva, bolo e brigadeiro) em relação às preparadas em solvente puro nas concentrações de 0,05; 0,10; 0,50; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>.

Verifica-se que o efeito de matriz associado ao erro sistemático constante tende a ser mais acentuado em concentrações menores. Esses erros provavelmente estão associados às oscilações instrumentais. Além disso, a coexistência de componentes da matriz e analitos podem afetar a absorção da molécula dos agrotóxicos na região do ultravioleta. Hajslová et. al (1998) também verificou em suas pesquisas que o efeito de matriz foi maior para as baixas concentrações de agrotóxicos [28].

Alves (2010) constatou a presença de efeito de matriz tanto para o aldicarb quanto para o carbofuran, em virtude das diferenças verificadas nos valores dos coeficientes angulares e lineares das curvas construídas no solvente e no extrato orgânico do café bebida, levando a erros sistemáticos proporcionais e constantes. Esse efeito de matriz foi mais acentuado para o carbofuran em concentrações maiores [10].

Pesquisas do efeito de matriz em amostras complexas (biológicas, alimentos e bebidas) envolvendo análise por CLAE com detector espectrométrico de massas têm sido relatados [5,7,8]. Entretanto, pouco se conhece sobre os mecanismos de efeito de matriz por CLAE-UV [26]. É evidente a necessidade de maiores pesquisas nessa área.

## 5.4 CONCLUSÃO

Na análise de carbamatos por CLAE-UV em água mineral, achocolatado, suco de uva, bolo e brigadeiro, o efeito de matriz apresentado foi relacionado ao erro sistemático constante associado, provavelmente, às oscilações instrumentais.

Para maior confiabilidade dos resultados, nas técnicas ELL-PBT e ESL-PBT para análise de carbamatos em matrizes de alimentos e bebidas por CLAE-UV, recomenda-se que as respostas sejam sempre obtidas com preparo de uma curva analítica substituindo o solvente puro por extratos da matriz isenta de agrotóxicos (branco da matriz).

## 5.5 REFERÊNCIAS

- [1] ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária). BRASIL. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008. <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/index.htm> >
- [2] SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola) 2010. Brasil lidera uso mundial de agrotóxicos. <[http://www.sindag.com.br/noticia.php?News\\_ID=1755](http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=1755)>
- [3] M. Passagli. Toxicologia Forense- Teoria e prática, 2 ed. Millenium, Campinas, 2009.
- [4] M. Ribani, C. B. G. Bottoli, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, L. F. C. Melo, Quím. Nova 27 (2004) 771-780.
- [5] A. Krueve, I. Leito, K. Herodes, Anal. Chim. Acta 651(2009) 75-80.
- [6] G. P. Pinho, A. A. Neves, M. E. L. R. Queiroz, F. O. Silvério, Quím. Nova 32 (2009) 987-995.
- [7] N. Mazzella, F. Delmas, B. Delest, J. of Environ. Monitoring 11(2009) 108-115.
- [8] A. Krueve, A. Kunnapas, K. Herodes, I. Leito, J Chromatogr A. 11 (2008) 58-66.
- [9] N. M. Aragão, M. C. C. Veloso, J. B. Andrade, Quím. Nova 32 (2009) 2476-2481.

- [10] R. D. Alves, Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2010.
- [11] P. Steliopoulos. *Accred Qual Assur* 15 (2010) 105–109.
- [12] H. P. Vieira, A. A. Neves, M. E. L. R. Queiroz, *Quím. Nova* 30 (2007) 535-540.
- [13] S. M. Goulart, M. E. L. R. Queiroz, A. A. Neves, J. H. Queiroz, *Talanta* 75/5 (2008) 1320-1323.
- [14] S. M. Goulart, R. D. Alves, A. A. Neves, J. H. Queiroz, T. C. Assis, M. E. L. R. Queiroz, *Anal. Chim. Acta* 671 (2010) 41–47.
- [15] G. P. Pinho, A. A. Neves, M. E. L. R. Queiroz, F. O. Silvério, *Food Chem.* 121 (2010) 251–256
- [16] G. P. Pinho, A. A. Neves, M. E. L. R. Queiroz, F. O. Silvério, *Food Control.* 21 (2010) 1307–1311
- [17] P. C. Meyer, R. E. Zund, *Statistical methods in analytical chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 1993. p. 81-134.
- [18] S. V.C. Souza, R. G. Junqueira, *Anal. Chim. Acta* 552 (2005) 25–35.
- [19] D. A. Belsley, E. Kuh, R. E. Welsch, *Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity*. New York: Wiley, 1980.
- [20] W. Horwitz, *Pure Appl. Chem.* 67 (1995) 331-343.
- [21] T. A. Ryan, B. L. Joiner, *Normal probability plots and tests for normality*. The State College: Pennsylvania State University, 1976.
- [22] H. Levene, *Robust tests for equality of variances*. In: Olkin, I.; Ghurye, S.G.; Hoeffding, W.; Madow, W.G.; Mann, H.B. (Ed.) *Contributions to probability and statistics*. Stanford: Stanford University Press, 1960.
- [23] M. B. Brown, A. B. Forsythe, *J. Am. Stat. Assoc.* 69 (1974). 364-367.
- [24] J. Durbin, G. S. Watson, *Biometrika* 38 (1951) 159-178.
- [25] N. Draper, H. Smith, *Applied regression analysis*. New York: Wiley. 1998.
- [26] N. M. Cassiano, J. C. Barreiro, L. R. R. Martins, R. V. Oliveira, *Quim. Nova* 32 (2009) 1021-1030.
- [27] A. A. Z. Rodrigues. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2010.
- [28] J. Hajslová, K. Holadova, V. Kocourek, J. Poustka, M. Godula, P. Cuhra, M. Kempny, *J Chromatogr. A* 800 (1998) 283-295.

## CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste trabalho mostraram que a ELL-PBT e a ESL-PBT são técnicas que podem ser recomendadas para aplicação em análises forenses e ambientais, na análise de aldicarb, carbofuran e carbaryl em cinco matrizes (água mineral, achocolatado, suco de uva, bolo e brigadeiro). O método apresentou alta frequência analítica, eficácia, seletividade e baixo custo, uma vez que o consumo de solvente orgânico utilizado foi mínimo (4,0 mL). Além disso, o método proposto apresentou porcentagens de recuperação elevadas para os três carbamatos em todas as matrizes.

Foi possível observar que a modificação da polaridade da fase extratora (acetonitrila) não favoreceu a extração dos carbamatos. Também foi verificado (capítulo 3) que a etapa de adição de água foi necessária para melhorar a eficiência da extração de matrizes sólidas. Os estudos de estabilidade de aldicarb e carbofuran (capítulo 4) em água mostram que a luz, o pH e a temperatura afetam a estabilidade dos carbamatos e que a adição de sal não interfere nessa estabilidade. Em meio alcalino esses compostos são mais instáveis do que em meio ácido. Em achocolatados e suco de uva, conclui-se que a luz, a composição da matriz e a temperatura afetam a estabilidade dos carbamatos. Nas matrizes sólidas de bolo e brigadeiro a estabilidade dos compostos não foi afetada significativamente por nenhum fator avaliado.

Na análise de carbamatos por CLAE-UV o efeito de matriz (capítulo 5) foi relacionado ao erro sistemático constante. Para maior confiabilidade dos resultados, nas técnicas ELL-PBT e ESL-PBT para análise de carbamatos em matrizes de alimentos e bebidas por CLAE-UV, recomenda-se que a quantificação seja feita empregando curvas analíticas em extratos da matriz isenta de agrotóxicos (branco da matriz).

Finalmente, esse trabalho possibilitou maior conhecimento da extração com partição a baixa temperatura em matrizes de coloração escura, comumente relacionadas a casos de intoxicações. A validação do método de extração e análise apresentou resultados satisfatórios, mostrando sua aplicabilidade em laboratórios de análises forenses e agrários em geral.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Desenvolvimento da extração com partição a baixa temperatura na análise multiresíduo de agrotóxicos em matrizes de interesse forense por CLAE-UV, principalmente aqueles associados ao “chumbinho”.
- Caracterização de produtos de degradação em estudos de estabilidade de carbamatos em alimentos e bebidas.
- Avaliação sistemática do efeito de coextrativos de matrizes de alimentos e bebidas utilizando a extração com partição a baixa temperatura e análise por CLAE-UV.
- Aplicação da técnica otimizada e validada em amostras reais dos Institutos de Criminalística.
- Otimização do método de extração com partição em baixa temperatura na análise multiresíduo em matrizes biológicas.

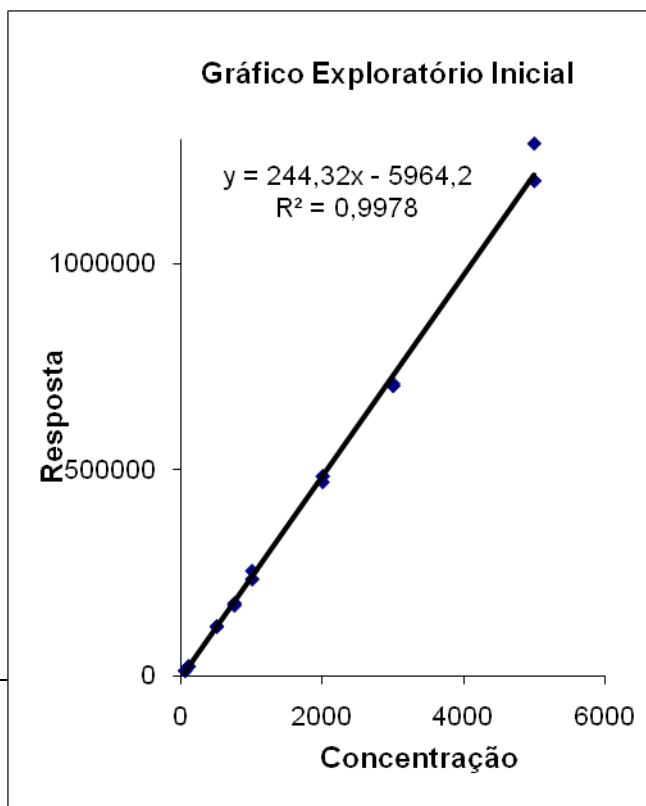


## ANEXO 1

### Tratamento estatístico da curva analítica do aldicarb preparada em solvente

Tabela de dados originais

Pontos	Concentração	Resposta
1	50	11993
2	50	11867
3	50	11923
4	100	22626
5	100	22599
6	100	22561
7	500	119877
8	500	118979
9	500	119527
10	750	175190
11	750	169968
12	750	175057
13	1000	234172
14	1000	234129
15	1000	254101
16	2000	483330
17	2000	469339
18	2000	483836
19	3000	703178
20	3000	707699
21	3000	702874
22	5000	1200243
23	5000	1200247
24	5000	1290242



Teste do Resíduo Padronizado Jackknife - Outliers

Pontos	$x_i$	$y_i$	$e_i$	$J_{ei}$	$r_i$	$h_i$
1	50	11993	1644,41	0,243	<b>0,249</b>	<b>0,080</b>
2	50	11867	1518,41	0,224	<b>0,230</b>	<b>0,080</b>
3	50	11923	1574,41	0,233	<b>0,238</b>	<b>0,080</b>
4	100	22626	333,29	0,049	<b>0,050</b>	<b>0,078</b>
5	100	22599	306,29	0,045	<b>0,046</b>	<b>0,078</b>
6	100	22561	268,29	0,040	<b>0,041</b>	<b>0,078</b>
7	500	119877	2031,35	0,297	<b>0,304</b>	<b>0,060</b>
8	500	118979	1133,35	0,166	<b>0,170</b>	<b>0,060</b>
9	500	119527	1681,35	0,246	<b>0,251</b>	<b>0,060</b>
10	750	175190	-2376,24	-0,346	<b>-0,354</b>	<b>0,052</b>
11	750	169968	-7598,24	-1,140	<b>-1,132</b>	<b>0,052</b>
12	750	175057	-2509,24	-0,366	<b>-0,374</b>	<b>0,052</b>
13	1000	234172	-3114,84	-0,454	<b>-0,463</b>	<b>0,047</b>
14	1000	234129	-3157,84	-0,460	<b>-0,469</b>	<b>0,047</b>
15	1000	254101	<b>16814,16</b>	<b>2,907</b>	<b>2,497</b>	<b>0,047</b>
16	2000	483330	7160,80	1,070	<b>1,066</b>	<b>0,051</b>
17	2000	469339	-6830,20	-1,018	<b>-1,017</b>	<b>0,051</b>
18	2000	483836	7666,80	1,150	<b>1,141</b>	<b>0,051</b>
19	3000	703178	-11873,57	-1,923	<b>-1,810</b>	<b>0,095</b>
20	3000	707699	-7352,57	-1,128	<b>-1,121</b>	<b>0,095</b>
21	3000	702874	-12177,57	-1,982	<b>-1,857</b>	<b>0,095</b>

22	5000	1200243	7426,70	1,315	1,293	0,306
23	5000	1200247	7430,70	1,316	1,293	0,306

**Teste de Ryan-Joiner - Normalidade dos resíduos**

Pontos	$p_i$	$q_i$	$e_i$
1	0,0269	-1,9287	-12177,56923
2	0,0699	-1,4766	-11873,56923
3	0,1129	-1,2112	-7598,244295
4	0,1559	-1,0114	-7352,569227
5	0,1989	-0,8455	-6830,20259
6	0,2419	-0,7001	-3157,835954
7	0,2849	-0,5682	-3114,835954
8	0,3280	-0,4456	-2509,244295
9	0,3710	-0,3293	-2376,244295
10	0,4140	-0,2173	268,2940185
11	0,4570	-0,1080	306,2940185
12	0,5000	0,0000	333,2940185
13	0,5430	0,1080	1133,347364
14	0,5860	0,2173	1518,41235
15	0,6290	0,3293	1574,41235
16	0,6720	0,4456	1644,41235
17	0,7151	0,5682	1681,347364
18	0,7581	0,7001	2031,347364
19	0,8011	0,8455	7160,79741
20	0,8441	1,0114	7426,697501
21	0,8871	1,2112	7430,697501
22	0,9301	1,4766	7666,79741
23	0,9731	1,9287	16814,16405

**Req = 0,9743**  
**Desvio da Normal :  $p > 0,10$**

**Conclusão**  
**Os resíduos seguem a Normal**

**Valores Críticos de R**

**$R_{\text{crítico}} (\alpha: 0,10) = 0,9640$**   
 **$R_{\text{crítico}} (\alpha: 0,05) = 0,9554$**   
 **$R_{\text{crítico}} (\alpha: 0,01) = 0,9366$**

**Hipóteses**

**$H_0$ : os resíduos seguem a distribuição Normal**  
 **$H_a$ : os resíduos seguem outra distribuição de probabilidade**

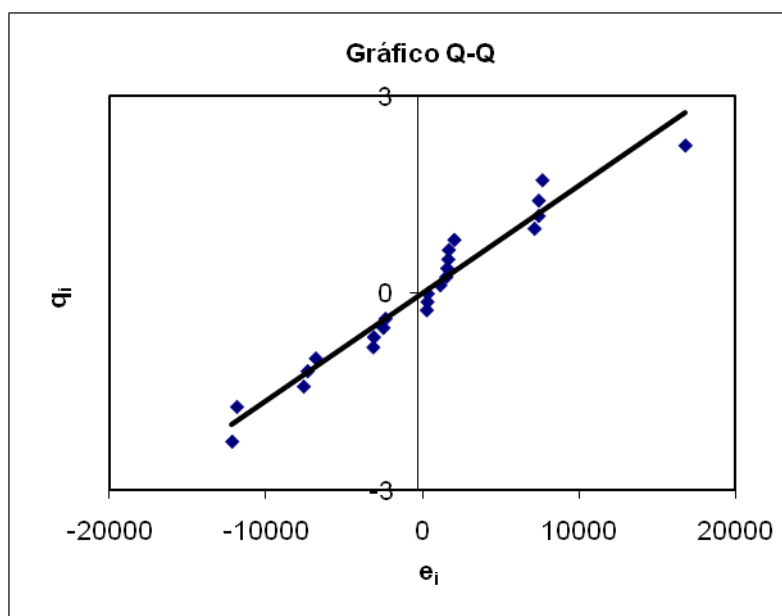


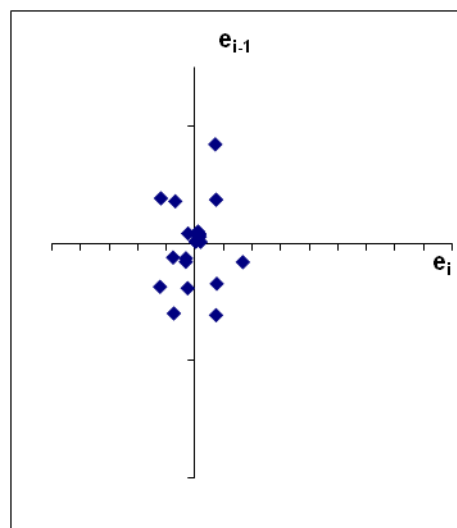
Gráfico quantil-quantil

	Máximo	Mínimo
$e_i$	16814,16405	-12177,57
$q_i$	1,93	-1,93

### Teste de Durbin-Watson - Independência dos resíduos

Pontos	$e_i$	$e_{i-1}$	$e_i - e_{i-1}$
1	1644,41		
2	1518,41	1644,41	-126,00
3	1574,41	1518,41	56,00
4	333,29	1574,41	-1241,12
5	306,29	333,29	-27,00
6	268,29	306,29	-38,00
7	2031,35	268,29	1763,05
8	1133,35	2031,35	-898,00
9	1681,35	1133,35	548,00
10	-2376,24	1681,35	-4057,59
11	-7598,24	-2376,24	-5222,00
12	-2509,244295	-7598,24	5089,00
13	-3114,835954	-2509,24	-605,59
14	-3157,835954	-3114,84	-43,00
15	16814,16405	-3157,84	19972,00
16	7160,79741	16814,16	-9653,37
17	-6830,20259	7160,80	-13991,00
18	7666,79741	-6830,20	14497,00
19	-11873,56923	7666,80	-19540,37
20	-7352,569227	-11873,57	4521,00
21	-12177,56923	-7352,57	-4825,00
22	7426,697501	-12177,57	19604,27
23	7430,697501	7426,70	4,00

### Gráfico de Durbin-Watson ( $e_i$ x $e_{i-1}$ )



### Hipóteses

**H<sub>0</sub>: não há autocorrelação entre os resíduos (Há independência)**

**H<sub>a</sub>: há autocorrelação entre os resíduos (Não há independência)**

**d = 1,786336864**

**$\alpha = 0,05$**

Correlação Positiva	$d_L$	Não conclusivo	$d_U$	Não há correlação	$4-d_U$	Não conclusivo	$4-d_L$	Correlação Negativa
	1,26		1,437458581	1,786	2,56254142		2,74	

**$\alpha = 0,025$**

Correlação Positiva	$d_L$	Não conclusivo	$d_U$	Não há correlação	$4-d_U$	Não conclusivo	$4-d_L$	Correlação Negativa
	1,14		1,354508339	1,786	2,64549166		2,86	

$\alpha = 0,01$

Correlação Positiva	$d_L$	Não conclusivo	$d_U$	Não há correlação	$4-d_U$	Não conclusivo	$4-d_L$	Correlação Negativa

**Teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado - Homoscedasticidade dos resíduos**

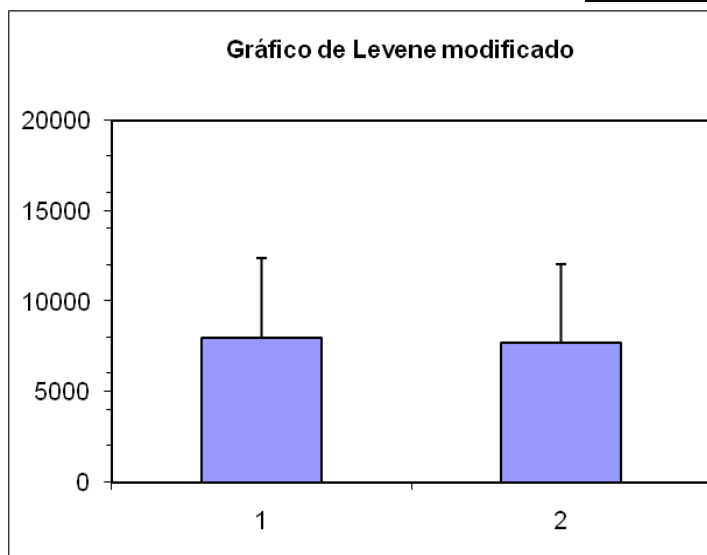
**Ho: As variâncias dos desvios não são diferentes (Há homoscedasticidade)**

**Ha: As variâncias dos desvios são diferentes (Há heteroscedasticidade)**

Grupo k=1		Grupo k=2	
$e_{1j}$	$e_{2j}$	$ d_1 $	$ d_2 $
	1644,4124		733,3207
-3114,836	1518,4124	0,0000	3848,1566
-3157,836	1574,41235	43,0000	3891,1566
16814,164	333,2940	19929,0000	16080,8434
7160,797	306,2940	10275,6334	6427,4767
-6830,203	268,2940	3715,3666	7563,5233
7666,797	2031,3474	10781,6334	6933,4767
-11873,569	1133,3474	8758,7333	12606,8899
-7352,569	1681,3474	4237,7333	8085,8899
-12177,569	-2376,2443	9062,7333	12910,8899
7426,698	-7598,2443	10541,5335	6693,3768
7430,698	-2509,2443	10545,5335	6697,3768

Estatística	Grupo k=1	Grupo k=2
$n_k$	11	12
$e_k$ (mediana)	-3,1E+03	7,3E+02
$d_k$ (média)	7,99E+03	7,71E+03
$SQD_k$	3,30E+08	2,04E+08
$s_p^2$	2,54E+07	
$t_L$	1,35E-01	
$p$	0,893884	

**Conclusão**  
 Não há evidência para rejeitar Ho  
 Há homoscedasticidade



Grupo 1	Grupo 2	t*EP
7990,1	7706,0	4375,1

### MMQO ou Análise de Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$ )

Estimativas dos parâmetros, seus desvios, significância e intervalos de confiança

Estatísticas da regressão		Estatísticas auxiliares	
$R^2$	0,99965	$S_{xy}$	1,18E+10
		$S_{xx}$	4,94E+07
		$S_{yy}$	2,82E+12
		$t_{critico}$	2,080
$n$	23	$J_{critico}$	2,086

Coeficiente	Valor	s (EP)	Stat t	p	IC95% inf	IC95% sup
Linear (a)	-1595,5307	1988,4468				
Angular (b)	238,88237	0,98111				

### ANOVA - Teste do desvio da linearidade e significância da regressão

FV	GL	SQ	QM	F	p	Sign.	$F_{critico}$
Regressão	1	2,82E+12	2,82E+12	59282,88	1,00E-37		4,3247937
Resíduo	21	9,98E+08	4,75E+07				
Desvio da linearidade	6	3,33E+11	5,54E+10	2,493	7,09E-02		2,790465
Entre níveis	7	2,49E+12					
Erro puro	15	3,34E+11	2,22E+10				
Total	22	2,82E+12					

#### Conclusão

A regressão é significativa

Não há desvio de linearidade

#### Hipóteses

$H_0$ : a regressão não é significativa

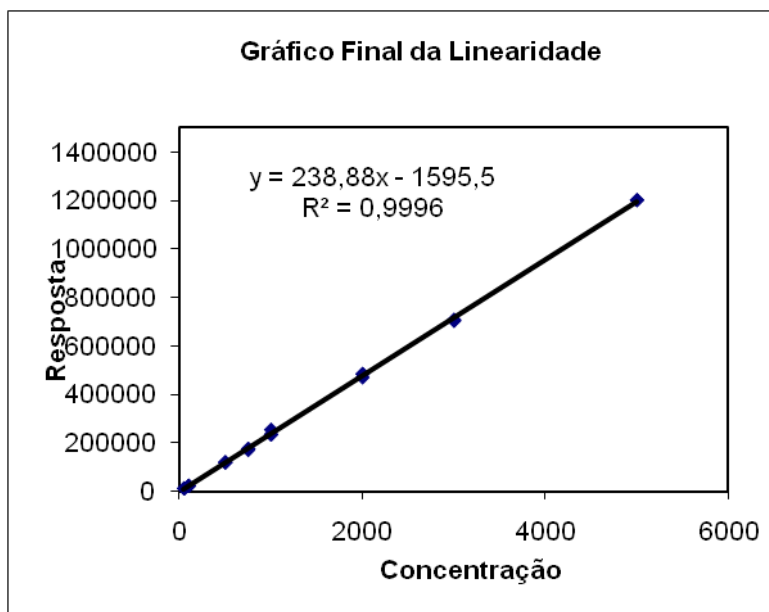
$H_a$ : a regressão é significativa

$H_0$ : o modelo linear simples é correto

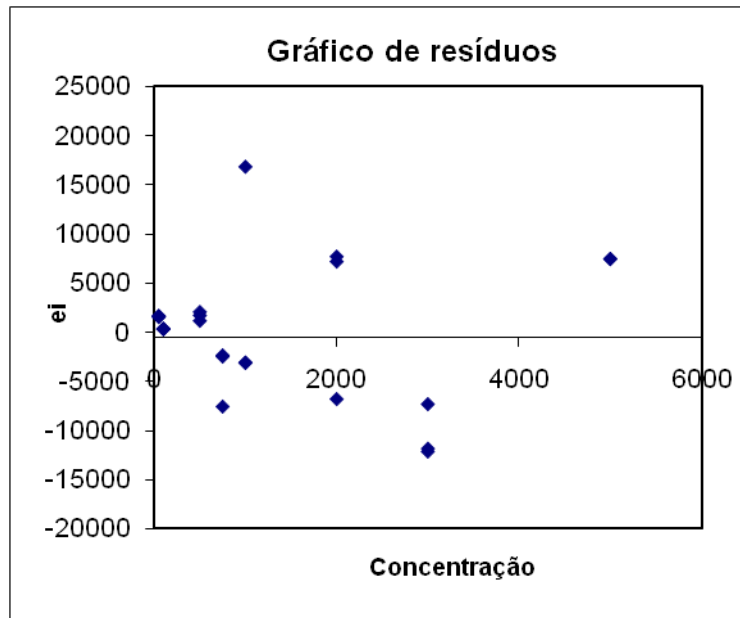
(Não há desvio da linearidade)

$H_a$ : o modelo linear simples não é correto

(Há desvio da linearidade)



	Máximo	Mínimo
$x_i$	5000	50,00
$y_i$	1200247,00	11867,00



	Máximo	Mínimo
$x_i$	5000	50,00
$e_i$	16814,16	-12177,57