UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Química

"Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de resíduos de pesticidas piretróides por HPLC em feijão"

Sérgio Henrique Monteiro

Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Jorge César Masini

São Paulo
30 de junho de 2006

INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
27-148

"Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de resíduos de pesticidas piretróides por HPLC em feijão"

SÉRGIO HENRIQUE MONTEIRO

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química - Área: Química Analítica.

Aprovado(a) por:

Prof. Dr. JORGE CÉSAR MASINI
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. MARINA FRANCO MAGGI TAVARES
IQ – USP

Prof. Dr. AMIR BERTONI GEBARA
Instituto Biológico

SÃO PAULO
13 DE SETEMBRO 2006

c
T
543.0894
M775d

Índice:

1. INTRODUÇÃO 11

1.1 Pesticidas 11

1.2 Piretróides 12

1.3 Resíduos de pesticidas 13

1.4 Cromatografia 13

1.5 Emprego da HPLC na analise de piretróides 17

1.6 Feijão 18

1.7 Validação 20

2. OBJETIVO 21

3. MATERIAIS E MÉTODO 21

3.1 Materiais 21

3.2 Reagentes 22

3.3 Equipamentos 23

3.4 Preparo de Reagentes / Padrões 24

3.4.1 Solução de eluição para GPC (Acetato de etila : Ciclohexano 1:1) 24

3.4.2 Solução da Fase Móvel (Acetonitrila : Água 8:2) 24

3.4.3 Preparo do sulfato de sódio PA anidro: 24

3.4.4 Preparo do cloreto de sódio PA: 24

3.4.5 Preparo dos padrões analíticos: 25

3.4.6 Procedimento de Fortificação 27

3.5 METODOLOGIA ANALÍTICA 27

3.5.1 Extração 27

3.5.2 Partição 28

3.5.3 Purificação em Coluna de GPC 28

3.5.4 Condições Cromatográficas 29

3.5.5 Fórmula para cálculo da concentração de piretróide na amostra (R) 32

3.5.6 Pesticidas a serem estudados 33

3.5.7 Amostras analisadas 38

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 38

4.1 Cultura Estudada 38

4.2 Otimização das Condições Cromatográficas 39

4.2.1 Comprimento de onda do detector UV-Visível 39

4.2.2 Fase Estacionária 40

4.2.3 Fase Móvel 40

4.2.4 Fluxo da fase móvel 40

4.2.5 Condições do integrador 45

4.3 Linearidade, faixa e função de resposta 45

4.4 Discussão do Desenvolvimento da metodologia de extração e purificação da amostra: 50

4.4.1 Extração 50

4.4.2 Partição 51

4.4.3 Purificação 51

4.5 Validação do método 51

4.5.1 Especificidade/Seletividade 58

4.5.2 Recuperação 61

4.5.3 Limite de Detecção 64

4.5.4 Limite de Quantificação 66

4.5.5 Precisão 67

4.5.6 Exatidão 68

4.5.7 Robustez 68

4.6 Resultado das análises de amostras de feijão 70

5. CONCLUSÃO 71

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 72

Índice de Tabelas:

Tabela 1 – Concentração dos piretróides na Solução Estoque 25

Tabela 2 – Concentração dos piretróides na Solução Intermediaria 26

Tabela 3 – Volume da Solução Intermediaria a ser pipetado para o preparo das soluções da curva analítica 26

Tabela 4 – Volume da Solução Intermediaria a ser pipetado para os três níveis de fortificação 27

Tabela 5 – Tempo de retenção médio dos piretróides 30

Tabela 6 – Limites máximos de resíduo permitido dos piretróides estudados, na cultura de feijão 39

Tabela 7 – Valores de resolução dos picos para solução CoqP-1 0,02 ng/µL 45

Tabela 8 – Valores de resolução dos picos para solução CoqP-2 0.02 ng/µL 45

Tabela 9 - Dados da equação linear e coeficiente de correlação das curvas analíticas de calibração 50

Tabela 10 – Recuperações para a Fenpropatrina 62

Tabela 11 – Recuperações para o Fenvalerato 62

Tabela 12 – Recuperações para a Cipermetrina 62

Tabela 13 – Recuperações para a Deltametrina 62

Tabela 14 – Recuperações para a Trans-permetrina 63

Tabela 15 – Recuperações para a Cis-permetrina 63

Tabela 16 – Recuperações para a Lambda-cialotrina 63

Tabela 17 – Recuperações para a Bifentrina 63

Tabela 18 – Limite de detecção para os piretróides estudados 65

Tabela 19 – Limite de quantificação para os piretróides estudados 66

Tabela 20 – Intervalos de coeficiente de variação (CV%) e recuperações aceitos com relação à concentração do analito na amostra 67

Tabela 21 – Recuperação e desvio padrão encontrados pelas duas equipes, A e B, que analisaram as amostras fortificadas. 69

Índice de Figuras:

Figura 1 – Cromatograma com todos os piretróides juntos em uma mesma solução 42

Figura 2 – Cromatograma da Solução Coq. P1, fenpropatrina, cipermetrina, fenvalerato e bifentrina 43

Figura 3 – Cromatograma da Solução Coq. P2, lambda–cialotrina, deltametrina, trans-permetrina e cis-permetrina 44

Figura 4 – Curva analítica de calibração da bifentrina 46

Figura 5 – Curva analítica de calibração da fenpropatrina 46

Figura 6 – Curva analítica de calibração do fenvalerato 47

Figura 7 – Curva analítica de calibração da cipermetrina 47

Figura 8 – Curva analítica de calibração da deltametrina 48

Figura 9 – Curva analítica de calibração da trans-permetrina 48

Figura 10 – Curva analítica de calibração cis-permetrina 49

Figura 11 – Curva analítica de calibração da lambda-cialotrina 49

Figura 12 – Cromatograma de amostra fortificada em 0,01 mg/kg com o Coq P1 52

Figura 13 – Cromatograma de amostra fortificada em 0,01 mg/kg com o Coq P2 53

Figura 14 – Cromatograma de amostra fortificada em 0,10 mg/kg com o Coq P1 54

Figura 15 – Cromatograma de amostra fortificada em 0,10 mg/kg com o Coq P2 55

Figura 16 – Cromatograma de amostra fortificada em 1,00 mg/kg com o Coq P1 56

Figura 17 – Cromatograma de amostra fortificada em 1,00 mg/kg com o Coq P2 57

Figura 18 – Cromatograma de uma amostra testemunha de feijão 58

Figura 19 – Cromatograma da solução padrão Cop. P1 1,00 ηg/μL injetada no cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura de elétrons 59

Figura 20 – Cromatograma da solução padrão Cop. P2 1,00 ηg/μL injetada no cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura de elétrons 60

Figura 21– Cromatograma da amostra de feijão testemunha injetada no cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura de elétrons 60

Figura 22– Cromatograma da amostra fortificada com o Coq. P1 injetada no cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura de elétrons 61

Figura 23 – Cromatograma da amostra fortificada com o Coq. P2 injetada no cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura de elétrons 61

RESUMO

Um método rápido utilizando cromatografia liquida (LC) foi desenvolvido para determinação simultânea de 7 pesticidas piretróides (bifentrina, cipermetrina, fenpropatrina, fenvalerato, permetrina, lambda-cialotrina, e deltametrina).

Os resíduos são extraídos com acetona e a partição realizada de acordo com o método multi-resíduos DFG-S19, substituindo diclorometano por acetato de etila/ciclohexano (1+1) e purificação usando cromatografia de permeação a gel com uma coluna Biobeads SX3 e acetato de etila/ciclohexano (1+1) como eluente. A separação por LC é realizada com uma coluna LiChrospher 100 RP-18 e acetonitrila/água (8+2) como fase móvel. Os pesticidas são detectados em 212nm.

As recuperações dos 7 pesticidas piretróides em amostras de feijão fortificadas em 0,010; 0,100; e 1,000 mg/kg ficaram entre 71-105%. A diferença particular deste método é o limite de quantificação, os quais ficaram entre 0,004-0,011 mg/kg, abaixo de muitos outros métodos de LC descritos na literatura.

A cromatografia a gás (GC) com detector de captura de elétrons é mais sensível que a LC, mas o método com LC facilita a identificação dos picos. A GC apresenta muitos picos enquanto a LC apresenta apenas um para a maioria dos piretróides. A análise com LC é uma boa alternativa para a determinação de resíduos de piretróides em feijão.

Durante o ano de 2005, um total de 48 amostras de feijão comercializadas na cidade de São Paulo, foram analisadas. Nenhum resíduo de pesticida piretróide foi detectado nas amostras.

ABSTRACT

A rapid liquid chromatographic (LC) method has been developed for simultaneous determination of 7 pyrethroid insecticides (bifenthrin, cypermethrin, fenpropathrin, fenvalerate, permethrin, lambda-cyhalothrin and deltamethrin) in beans.

Residues are extracted from beans with acetone and the partition realized according to the multi-residue method DFG-S19, replacing dichloromethane by ethyl acetate/cyclohexane (1+1) and cleaned up using gel-permeation with a Biobeads SX3 column and ethyl acetate/cyclohexane (1+1) as eluant. LC separation is performed on a LiChrospher 100 RP-18 column with acetonitrile/water (8+2) as mobile phase. The pesticides are detected at 212 nm.

Recoveries of 7 pyrethroid insecticides from beans fortified at 0.010; 0.100; 1.000 mg/kg levels were 71-105 %. The particular differential of this method is the quantification limits, which were between 0.004-0.011 mg/kg, lower than most of the limits reported for LC methods described in the literature.

The gas chromatographic (GC) with electron capture detection is more sensitive than LC, but the LC method facilitates the identification of the peaks. Analysis of pyrethroids by GC shows several peaks, but LC shows only one for most pyrethroids. The analysis by LC was a good alternative for determination pyrethroid residues in beans.

During 2005 year, a total of 48 bean samples commercialized in Sao Paulo City were analyzed. No residues of pyrethroids pesticides were detected in the samples.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pesticidas

Os pesticidas (também denominados de agrotóxicos, defensivos agrícolas, agroquímicos, biocidas, praguicidas ou produtos fitossanitários) são produtos químicos utilizados no combate as pestes, doenças e ervas daninhas, as quais causam prejuízos aos produtores agrícolas, reduzindo a qualidade e quantidade da produção.

Os pesticidas, diferentemente dos fertilizantes e sementes melhoradas, cujo uso têm como resposta uma produtividade maior e têm como função evitar quedas de produção por ataques de pestes, doenças de plantas e ervas daninhas. Servem também como coadjuvantes na preservação de produtos armazenados. Porém, quando utilizados inadequadamente podem provocar sérios problemas para a saúde humana e para o meio ambiente. (FERREIRA & TSUNECHIRO, 1998).

O Codex Alimentarius (Programa das Nações Unidas sobre Harmonização de Normas Alimentares gerenciado pelo FAO/ WHO – Food and Agriculture Organization e World Health Organization) conceitua pesticidas como quaisquer substâncias utilizadas para prevenir, destruir, atacar, repelir ou controlar pragas, incluindo espécies de plantas ou animais que devam estar presentes durante a produção, estocagem, transporte, distribuição ou processamento de alimentos e rações animais, ou que devam ser administradas a animais para o controle de ectoparasitas. O termo inclui substâncias utilizadas como reguladores de crescimento para plantas, desfoliantes, dessecantes, agentes promotores de amadurecimento de frutos, inibidores de germinação e substâncias que são aplicadas aos grãos antes e depois da colheita para evitar a deterioração do alimento durante a estocagem e transporte. São excluídos desse conceito os fertilizantes, nutrientes animais ou vegetais, aditivos alimentares e medicamentos de uso veterinário. (CODEX, 1997).

Nos últimos anos, a luta mundial contra as pragas da agricultura e o controle de vetores e zoonose tem se baseado no uso intensivo de pesticidas. Dentre esses, os mais utilizados atualmente são os organofosforados, os carbamatos e os piretróides, sendo estes últimos os que serão abordados no presente projeto.

1.2 Piretróides

De acordo com GEBARA (1998), as piretrinas são extraídas de flores de plantas do gênero *Chrysanthemum*; as propriedades destas plantas são conhecidas pelo menos desde o primeiro século da nossa era, como testemunhado pelos chineses (TESSIER, 1983), mas foram os comerciantes armênios que a trouxeram do Cáucaso e de regiões vizinhas, para a Europa Ocidental. O Piretro utilizado desde aproximadamente 400 anos no controle de insetos, era conhecido como o "Pó da Pérsia" (LHOSTE, 1966). Em 1880 o piretro foi introduzido no Japão, que passou a exportá-lo em 1886, tendo sido, até a Primeira Guerra Mundial, o principal produtor.

A estrutura química dos compostos biologicamente ativos do piretro, as piretrinas naturais, tornou-se conhecida em 1924. A partir de então foi possível produzir análogos sintéticos da piretrina. O primeiro destes piretróides a ser usado em saúde pública foi a aletrina, sintetizada em 1949 por SCHECHTER et al e logo em seguida comercializada. A estabilidade dos piretróides não era então satisfatória; podiam ser decompostos principalmente pela ação da luz. As investigações prosseguiam de modo intenso em vários países, principalmente Inglaterra e Japão (BRADBURY & COATS, 1989). O fenvalerato começou a ser produzido no Japão em 1976. Na mesma época surgiu, na Inglaterra, a permetrina. Foram estes os primeiros inseticidas piretróides fotoestáveis, denominados de segunda geração. Em seguida vieram a cipermetrina e a deltametrina. No fim da década de 1980 surgiram os inseticidas de terceira geração, isômeros mais ativos de compostos já conhecidos, tais como: ciflutrina, lambda-cialotrina.

1.3 Resíduos de pesticidas

Resíduos de pesticidas são definidos como a presença destas substâncias nos alimentos, grãos e outras culturas, resultantes do uso de pesticidas (CODEX, 1997). O termo inclui também qualquer derivado de um pesticida como os produtos de conversão, metabólitos, produtos de reação e impurezas que possam ser consideradas de importância toxicológica.

Como a presença de pesticidas nos alimentos revela tendências de crescimento, medidas preventivas e de controle devem ser incrementadas.

Portanto é de máxima importância o estabelecimento de medidas eficientes de controle para proteger a saúde da população. Entre estas medidas destaca-se o monitoramento ou análises de vigilância, amplas e freqüentes, realizadas nos alimentos, principalmente naqueles consumidos "in natura" como hortaliças e frutas, a fim de detectar a presença de resíduos de pesticidas.

Para dar suporte ao monitoramento de resíduos de pesticidas, novas técnicas e métodos são necessários para otimizar a qualidade da análise e também facilitar o trabalho dos analistas.

1.4 Cromatografia

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação de componentes de uma mistura através da distribuição desses entre duas fases que estão em íntimo contato. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela; durante a passagem da fase móvel sobre a estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes. Desta forma, o termo é empregado a várias técnicas de separação, baseadas na partição da amostra entre uma fase móvel, que pode ser líquida ou gasosa, e uma fase estacionária (KAZAKEIRCH Y. & McNAIR H., 2000).

Há vários tipos de técnicas cromatográficas e de acordo com COLLINS et al. (1993), são:

a) Cromatografia em papel: esta técnica separa os componentes de uma mistura em função do deslocamento diferencial dos solutos arrastados por uma fase móvel, sendo seletivamente retidos pela fase estacionária;
b) Cromatografia em camada delgada: os componentes de uma mistura são separados através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana;
c) Cromatografia por adsorção: neste método a coluna cromatográfica encontra-se recheada por um sólido (fase estacionária) que é capaz de adsorver substâncias presentes na fase móvel (líquido);
d) Cromatografia por troca iônica: a fase estacionária encontra-se ionizada e o soluto ao ser eluído na coluna modifica seletivamente a carga desta fase, permitindo a separação das substâncias químicas;
e) Cromatografia de permeação em gel: é também conhecida como cromatografia por exclusão, filtração ou cromatografia em peneira molecular de difusão restrita. É um método simples, introduzido em 1960, que separa substâncias, desde aquelas com massa molar abaixo de 1.000 Daltons, até vários milhões, variando-se apenas a matriz do gel da fase estacionária - géis de dextrano (Sephadex®), géis de poliacrilamida (Biogel), géis de ágar e agarose, dentre outros. As macromoléculas do gel apresentam ligações cruzadas e insolúveis aos solventes (fase móvel); o gel apresenta-se inchado com a fase móvel que carrega as substâncias a serem separadas. O caráter da fase estacionária é que determina o movimento das moléculas a serem separadas. Na cromatografia de permeação em gel a distribuição homogênea entre a fase móvel e estacionária é muito intrincada, as moléculas menores do soluto, penetram nos poros da fase estacionária e ficam mais tempo retidas, enquanto as maiores moléculas não têm acesso a estes poros, passando direto pela coluna.

f) Cromatografia por bioafinidade: baseia-se principalmente nas propriedades biológicas ou funcionais das espécies que interagem, a substância a ser analisada e a fase estacionária;

g) Cromatografia gasosa: baseia-se na separação de gases ou substâncias volatilizáveis, estáveis termicamente, presentes na amostra. A separação dos componentes se dá através da passagem de um gás inerte (fase móvel - nitrogênio, hélio, hidrogênio ou argônio) pela coluna cromatográfica, promovendo o arraste das diferentes substâncias sobre a fase estacionária. Esta última apresenta um filme com determinada natureza química, que confere a polaridade à coluna, promovendo através de interações entre as moléculas da amostra e da fase estacionária a separação das substâncias químicas. Quando a fase estacionária é um sólido (sílica, alumina, carvão ou polímeros porosos) a separação baseia-se em mecanismos de adsorção, nos quais os solutos são diferencialmente adsorvidos e dessorvidos, retornando para a fase móvel, promovendo a separação. É uma técnica rápida, de alto poder de resolução, com grande sensibilidade, podendo-se obter resultados em concentrações de miligramas a picogramas do princípio ativo; permite tanto a separação, como a identificação e quantificação das substâncias presentes na amostra, desde que comparada a um produto de referência comumente chamado de padrão. Na cromatografia gasosa o detector é um dispositivo que transforma num sinal elétrico adequado a variação da composição do gás de arraste ao sair da coluna cromatográfica.

h) Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE ou HPLC – high *performance liquid chromatography*): esta moderna técnica de cromatografia líquida é um importante membro de uma família de técnicas de separação. Vários termos têm sido utilizados para denominar esta técnica: alta pressão, alta velocidade, alto desempenho, alta resolução e alta eficiência, sendo este último o mais aceito na língua portuguesa. A partir dos anos 70 esse sistema passou por um avanço considerável, principalmente por ser possível rechear colunas com partículas de pequeno

tamanho e equipamentos que trabalham em altas pressões. Esta técnica cromatográfica emprega pequenas colunas fechadas e recheadas de materiais especialmente preparados para receber uma fase móvel que é eluída em alta pressão; para isso uma válvula especial permite que a amostra seja introduzida no sistema. Na HPLC a separação das substâncias ocorre devido à afinidade das mesmas com a fase estacionária ou fase móvel, isto é, está relacionada ao coeficiente de partição da substância (McMASTER & MARVIN, 1994). Os detectores empregados principalmente em análise de resíduos de pesticidas são: UV-Visível e fluorescência.

i) Eletroforese capilar (EC): o fenômeno denominado eletroforese é definido como sendo a migração de espécies carregadas eletricamente, que ocorre quando as mesmas são dissolvidas ou suspensas em um eletrólito, através do qual uma corrente elétrica é aplicada (HEIGER, 1997). Esta técnica de separação foi desenvolvida pelo químico Arne Tiselius para o estudo de proteínas em soro (TISELIUS, 1930), e por este trabalho ele ganhou o prêmio Nobel em 1948. Este método, denominado solução livre, era bastante limitado devido à instabilidade do aparelho, e mais significativamente, pelos efeitos de difusão e aquecimento gerados pelo campo elétrico, os quais comprometiam a resolução (separação) dos compostos. Estes efeitos foram minimizados com a introdução de suporte (gel ou papel) que ajudou a conter o movimento livre dos analitos, de forma que o efeito da difusão fosse diminuído. Entretanto este sistema oferecia um baixo nível de automação, tempos de análise longos e após a separação a detecção era feita visualmente. A eletroforese capilar (EC) é uma técnica que foi introduzida em 1981, por JORGENSON e LUKACS, 1981 e tem sido aceita cada vez mais, como um importante método analítico. Em sua forma mais simples a EC é uma aproximação da técnica original, descrita por Tiselius, porém emprega-se um tubo capilar, preenchido com um eletrólito, conforme o próprio nome sugere (TAVARES, 1997).

1.5 Emprego da HPLC na analise de piretróides

Na cromatografia líquida de alta eficiência é muito importante determinar qual será o tipo de substância química a ser analisada e em que tipo de matriz ela está presente, fatores importantes na escolha da metodologia de preparo da amostra, extração, purificação e identificação e quantificação. A escolha do equipamento (bomba, coluna e detector) de HPLC está relacionada às condições de análise (matriz e pesticidas) e aos custos de compra (equipamento, solventes e outros materiais), manutenção e treinamento.

Para uma otimização no emprego de HPLC em análise de resíduos de pesticidas em alimentos (origem vegetal e animal), e amostras ambientais, é necessário que ocorra um preparo adequado da matriz a ser analisada.

Um levantamento bibliográfico sobre a utilização de HPLC para a determinação de resíduos de pesticidas piretróides mostra vários métodos analíticos para este fim. Os trabalhos encontrados mostraram que as fases estacionárias mais utilizadas para a determinação de inseticidas piretróides em diferentes matrizes são as fases reversas, em especial, colunas octadecil (C18). Quanto às fases móveis, as mais utilizadas são as misturas de água (H_2O), acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH), sendo que o detector mais utilizado é o uv-Visível. (ZANELLA et al. 1998; BISSACOT & VASSILIEFF 1997; GALERA et al. 1996; CHEN & WANG 1995; DARWISH 1994; DEBON & SEGALEN 1989; HADDAD et al. 1989; BOTTOMLEY & BAKER 1984; BENGSTON et al. 1983; MUSZAT et al 1986).

A cromatografia a líquido de alta eficiência pode ser uma técnica alternativa para a detecção e quantificação de alguns pesticidas em especial os piretróides que possuem alta massa molar em comparação com a maioria dos pesticidas.

1.6 Feijão

Segundo informações recolhidas do na pagina eletrônica da EMBRAPA (MAGALHÃES, 2005), o feijão é um alimento básico para o brasileiro, chegando a ser um componente obrigatório na dieta diária da população. A média atual de consumo de feijão é de 14,9 kg brasileiro/ano. A preferência do consumidor é regionalizada e diferenciada principalmente quanto à cor e ao tipo de grão.

Em 2004, cerca de 86,1% da produção mundial desta leguminosa ficou restrita a 5 países: Brasil, China, Índia, México e Myamar, tendo o Brasil contribuído com 23,6%. Estes dados colocam o Brasil como o primeiro produtor mundial de feijão. Neste mesmo ano, a produção brasileira de feijoeiro comum foi de 2,52 milhões de toneladas, em uma área colhida de 2,64 milhões de hectares, composta por aproximadamente 20% do tipo preto e 80% de outras variedades, em que o grupo comercial carioca participa com 90%.

O feijoeiro comum (feijão carioquinha) é cultivado ao longo do ano, na maioria dos estados brasileiros, proporcionando constante oferta do produto no mercado, sendo cultivado desde cultura de subsistência em pequenas propriedades até altamente tecnificadas em cultivos empresariais. A Região Sul ocupa lugar de destaque no cenário nacional, respondendo por 37% da produção, seguida da Região Sudeste com 31%, Região Nordeste com 16%, Região Centro-Oeste com 13%, e da Região Norte com 3%.

Os grãos de feijão representam uma importante fonte protéica na dieta humana dos países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais, particularmente nas Américas (47% da produção mundial) e no leste e sul da África (10% da produção mundial). O feijão apresenta componentes e características que tornam seu consumo vantajoso do ponto de vista nutricional. Entre eles citam-se o conteúdo protéico, o teor elevado de lisina, a fibra alimentar, alto conteúdo de carboidratos complexos e a presença de vitaminas do complexo B (WANDER, 2006).

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris L.*) é a espécie mais cultivada entre as demais espécies deste gênero. Considerando todos os gêneros e espécies englobadas nas estatísticas da FAO, o feijoeiro comum envolve cerca de 107 países produtores em todo o mundo. O Brasil e o México são os maiores produtores do gênero Phaseolus. Entretanto, a produção brasileira de feijão tem sido insuficiente para abastecer o mercado interno, devido à redução na área plantada, da ordem de 35%, nos últimos 17 anos.

Mesmo tendo este aumento de 48% na produtividade, estes dados ainda resultam numa diminuição de 4% na produção, não sendo, ainda, suficiente para atender a demanda.

O cultivo dessa leguminosa é bastante difundido em todo o território nacional, no sistema solteiro ou consorciado com outras culturas. É reconhecida como cultura de subsistência em pequenas propriedades, muito embora nos últimos 20 anos, tenha havido crescente interesse de produtores que adotam tecnologias avançadas, incluindo a irrigação e a colheita mecanizada.

Dependendo da região, o plantio de feijão no Brasil é feito ao longo do ano, em três épocas, de tal forma que, em qualquer mês, sempre haverá produção de feijão em algum ponto do país, o que contribui para o abastecimento interno (MAGALHÃES, 2005).

O feijoeiro ocupa o 3º lugar em termos de área plantada com grãos no Brasil (4,2milhões de ha), mas em termos de utilização de pesticidas, é o 10º classificado em quantidade consumida (3.844 t de ingredientes ativos - i.a.- em 2003) e o 9º em valor gasto (US$ 85.600.000), superado por culturas como arroz, 1262 trigo e algodão, cultivadas em áreas bem inferiores. Assim, o consumo relativo de pesticidas na cultura do feijoeiro é de 1,37 kg de i.a./ha, ocupando o 11º lugar, e o dispêndio relativo é de US$ 20,28 /ha, ocupando o 12º lugar, em 2003. Comparando-se com diversas culturas, a do feijoeiro é superada, entre outras, pela do tomate (40 kg i.a./ha), batata (25 kg i.a./ha), algodão (11 kg i.a./ha), soja (3 kg i.a./ha), trigo (1,8 kg i.a./ha), milho (1,7 kg i.a./ha) e arroz (1,4 kg i.a./ha) (ZUPPI et al, 2006).

Os fungos, tanto no campo quanto no armazém, são os microorganismos responsáveis pelos principais danos agrícolas ao feijão. Além dos fungos, outros causadores de prejuízos em feijão armazenado são os insetos e a própria atividade metabólica (respiração do grão). Nas condições tropicais os insetos têm a maior importância. As estratégias de controle de campo e de armazém são similares e dentre eles destacam-se os controles físicos, químicos e biológicos. De acordo com SEBRAE (2006), o controle mais efetivo e economicamente mais viável é o químico, feito com pesticidas organofosforados ou piretróides.

1.7 Validação

A validação de um método estabelece, através de estudos sistemáticos de laboratório, que o método é adequado à finalidade, isto é, suas características de desempenho são capazes de produzir resultados correspondentes às necessidades do problema analítico (AOAC/FAO/IAEA/IUPAC,1999).

Os parâmetros de validação de métodos analíticos envolvem: Especificidade/Seletividade, Função de Resposta (gráfico analítico), Intervalo de Trabalho (Faixa), Linearidade, Exatidão, Precisão, Limite de Detecção, Limite de Quantificação e Robustez (BRITO et al, 2003). Esses parâmetros serão definidos no decorrer do Item de Resultados e Discussão.

Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré–requisitos estabelecidos. Portanto, existem diferenças entre a execução de experimentos que determinam os diversos parâmetros (coleta dos dados experimentais) e a validação. Essa deve avaliar a relação entre os resultados experimentais e as questões que o método se propõe a responder.

O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito.

A validação deve ser considerada quando se desenvolve ou efetua adaptação em metodologias já validadas, inclusão de novas técnicas ou o uso de diferentes equipamentos.

2. OBJETIVO

Desenvolver, otimizar e validar técnica de cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por espectrofotometria de absorção molecular na região do ultra-violeta para determinação de resíduos de pesticidas da classe dos piretróides em feijão.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Materiais

- Balão de fundo redondo de 250 mL
- Béqueres de várias capacidades
- Erlenmeyer de 25 mL
- Frasco Schott® de 250 mL
- Tubo de vidro graduado com rolha esmerilhada de 10mL
- Proveta de 100, 200 e 500 mL
- Pipetas volumétricas de várias capacidades
- Pipeta Pauster
- Funil analítico de vários tamanhos
- Baqueta de vidro
- Pinça de metal
- Haste de aço para Ultra-Turrax®
- Cápsula de porcelana

- Seringa de vidro graduada de 10 mL (para GPC)
- Microseringa de vidro graduada de 500 µL sem ponta para HPLC
- Microseringa de vidro graduada de 100 µL
- Pipetador automático de 2,0 mL com graduação de 100 µL
- Espátula
- Estante para tubos
- Balão Volumétrico de 10 e 100 mL
- Funil para Filtração de Água
- Membrana Filtrante de 0,45 µm
- Algodão
- Coluna para HPLC Merck® RP 18 5µm x 25 cm x 0,46mm

3.2 Reagentes

- Sulfato de sódio PA
- Cloreto de Sódio PA
- Acetona RP
- Acetato de etila RP
- Ciclohexano RP
- Resina BIO-BEADS® SX3 (Bio-Rad®) - para GPC
- Acetonitrila grau HPLC
- Água grau HPLC

3.3 Equipamentos

- Ultra-Turrax®
- Mufla
- Dessecador de vidro
- Balança analítica
- Balança semi-analítica
- Evaporador rotativo
- Ultra Som
- Gerador de nitrogênio Peak Scientific®
- Bidestilador de Água
- Sistema de Purificação de Água MilliQ®
- Aparelhagem para cromatografia de permeação em gel (GPC)
- Banho Maria a 35°C
- Cromatógrafo Líquido:

  Bomba Varian® 9012;

  Detector Varian® UV-Visível 9050

  Integrador Varian® 4400

  Estabilizador de corrente
- Cromatógrafo a gás Agilent® 6890

3.4 Preparo de Reagentes / Padrões

3.4.1 Solução de eluição para GPC (Acetato de etila : Ciclohexano 1:1)

Em balão volumétrico, misturar 500 mL de acetato de etila RP com 500 mL de Ciclohexano RP e homogeneizar bem.

3.4.2 Solução da Fase Móvel (Acetonitrila : Água 8:2)

Em balão volumétrico misturar 800 mL de acetonitrila HPLC com 200 mL de água deionizada, homogeneizar bem e deixar em ultra-som por aproximadamente 30 min.

3.4.3 Preparo do sulfato de sódio PA anidro:

Aquecer em mufla o sulfato de sódio por pelo menos 2 horas a 550°C, em cápsula de porcelana. Deixar esfriar em dessecador. Armazenar em frasco bem fechado dentro do dessecador.

3.4.4 Preparo do cloreto de sódio PA:

Aquecer em mufla o cloreto de sódio por pelo menos 2 horas a 550°C, em cápsula de porcelana. Deixar esfriar em dessecador. Armazenar em frasco bem fechado dentro do dessecador.

3.4.5 Preparo dos padrões analíticos:

3.4.5.1 Solução Estoque

Pesar 100 mg do padrão primário dos produtos, fenvalerato, fenpropatrina, deltametrina, lambda-cialotrina, cipermetrina e bifentrina e permetrina, e dissolver em 100 mL de acetonitrila.

Os padrões primários apresentam purezas diferentes para cada um dos produtos, portanto, a concentração da solução estoque não será igual para todos os produtos. A concentração exata para cada produto na solução estoque esta apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentração dos piretróides na Solução Estoque.

Piretróides	Concentração ng/µL
Fenpropatrina	1021
Lambda-cialotrina	1001
Cipermetrina	998
Deltametrina	1043
Fenvalerato	1001
Permetrina	997
Bifentrina	997

3.4.5.2 Solução Intermediária

Pipetar 1,00 mL da solução estoque e transferir para balão de 100 mL dissolvendo em acetonitrila:água (8:2). A concentração exata para cada produto na Solução Intermediária esta apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Concentração dos piretróides na Solução Intermediaria.

Piretróides	Concentração ng/µL
Fenpropatrina	10,21
Lambda-cialotrina	10,01
Cipermetrina	9,98
Deltametrina	10,43
Fenvalerato	10,01
Permetrina	9,97
Bifentrina	9,97

3.4.5.3 Soluções da curva analítica

Pipetar o volume da Solução Intermediária, correspondente a cada solução de acordo com a Tabela 3 e transferir para balão de 10 mL completando com acetonitrila : água (8:2).

Tabela 3 – Volume da Solução Intermediaria a ser pipetado para o preparo das soluções da curva analítica.

Concentração da solução (ηg/µL)	Volume da solução intermediaria
2,00	2 mL
1,00	1 mL
0,75	0,75 mL
0,50	0,50 mL
0,25	250 µL
0,05	50 µL
0,02	20 µL

3.4.6 Procedimento de Fortificação

Adicionar o volume da Solução Intermediária, de acordo com a Tabela 4 em 50 gramas da Amostra Testemunha, deixar em descanso por 15 min.

Tabela 4 – Volume da Solução Intermediaria a ser pipetado para os três níveis de fortificação.

Nível de Fortificação (mg/kg)	Volume da Solução Intermediaria
0,01 mg/kg	50 µL
0,10 mg/kg	0,5 mL
1,00 mg/kg	5,0 mL

3.5 METODOLOGIA ANALÍTICA

3.5.1 Extração

- Pesar em frasco de vidro tipo Schott® de 250 mL, 20 g de amostra, previamente triturada e homogeneizada. Utilize para isso uma balança semi-analítica com resolução até 0,1 mg
- Adicionar 36,5 g de água deionizada e homogeneizar agitando com a mão
- Adicionar 100 mL de acetona
- Homogeneizar no Ultra Turrax® por 3 minutos
- Adicionar 17,5 g de NaCl
- Homogeneizar no Ultra Turrax® por mais 1 min

3.5.2 Partição

- Adicionar 50 mL de solução acetato de etila : ciclohexano (1:1)
- Homogeneizar no Ultra Turrax® por 1 minuto
- Deixar em repouso para separar as fases por aproximadamente 30 minutos
- Coletar 100 mL da fase orgânica (sobrenadante)
- Filtrar em funil analítico com algodão coberto com 50 g de sulfato de sódio anidro recolhendo em balão de fundo redondo de 250 mL
- Lavar o sulfato de sódio com 2 vezes 10 mL de solução Acetato de Etila : Ciclohexano (1:1)
- Concentrar no evaporador rotativo a 40° C e 40 psi até aproximadamente o volume de 2 mL
- Secar com fluxo suave de nitrogênio
- Ressuspender em 10 mL da solução eluente do GPC (acetato de etila : ciclohexano (1:1))

3.5.3 Purificação em Coluna de GPC

- Filtrar os 10 mL obtidos anteriormente em Na_2SO_4 anidro com auxílio de funil pequeno de vidro e algodão lavado com diclorometano
- Injetar 5 mL, da solução filtrada, no GPC com vazão de 5mL/min usando a solução acetato de etila : ciclohexano (1:1) como eluente
- Desprezar a solução eluida referente aos primeiros 18 minutos (90 mL)
- Recolher em balão de 250 mL os próximos 110 mL, onde se encontram os piretróides. Este volume corresponde a 22 minutos de tempo de eluição
- Efetuar a limpeza do GPC eluindo a solução por mais 5 minutos (25 mL)

- Concentrar em evaporador rotativo, a 40°C e pressão de 55 psi, os 110 mL recolhidos no GPC até um volume de aproximadamente 2 mL
- Secar em N_2 com fluxo suave
- Lavar o balão com 5 mL de acetonitrila : água (8:2) e recolher em tubo graduado de 10 mL com tampa e boca esmerilhada
- Injetar 100 µL no cromatógrafo a líquido com detector UV-Visível

3.5.4 Condições Cromatográficas

- Análise por HPLC

Cromatógrafo a Líquido Varian® formado pelos seguintes componentes:

Bomba 9012

Detector UV-Visível 9050

Integrador 4400

Coluna: Merck® RP 18 5 µm x 15 cm x 0,46 mm

Fluxo: 0,8 mL/minuto

Tempo de Corrida: 30 minutos

Tempo de estabilização: 2 minutos

Comprimento de onda: 212 nm

Range: 0,020 Aufs

Loop: 100 µL

Fase Móvel: acetonitrila : água (8:2)

- Condições do integrador:

Integrador 4400 Varian®
Atenuação: 16
Velocidade do papel: 0,5 cm/min
Inibição de integração: integrar após 11 min
Tipo de integração: Valley-to-Valley Baselines

Os tempos de retenção aproximados para todos os piretróides estudados aparecem na Tabela 5:

Tabela 5 – Tempo de retenção médio dos piretróides

Piretróide	**Tempo de Retenção (min)**
Fenpropatrina	11,9
Lambda-cialotrina	12,8
Cipermetrina	13,3
Deltametrina	14,0
Fenvalerato	14,7
Trans-permetrina	16,8
Cis-permetrina	19,5
Bifentrina	24,3

- Análise por GC-ECD

Injetor:

Modo: Slitless

Temperatura: 230°C

Fluxo da purga: 60 mL/min

Tempo de purga: 0,75 min

Tipo do gás: Nitrogênio

Vol. Injeção: 1 μL

Coluna:

SPB-20; 30m; 0,32 mm ID; Filme 0,25 μm (Supelco® 2-4088)

Fluxo: 1,0 mL/min

Detector:

μECD

Temperatura: 300 °C

Fluxo combinado (make-up+coluna): 60 mL/min

Tipo de gás: Nitrogênio

Forno:

Temperatura inicial: 100 °C

Tempo de espera: 1 min

Rampa: 25 °C/min

Temperatura 2: 260 °C

Rampa: 2°C/min

Temperatura 3: 280 °C

Tempo de espera: 10 min

3.5.5 Fórmula para cálculo da concentração de piretróide na amostra (R)

$$R = \frac{C * V_i * A_A}{m * V_u * A_P} * f \qquad \text{onde:}$$

$$f = \frac{V_f * V_{ex} * V_{R2}}{V_{R1} * V_{R3}}$$

$$f = \frac{5 * 142,5 * 10}{100 * 5}$$

$$f = 14,25$$

Onde:

C = concentração do padrão (ηg/μL)

V_i = volume do padrão injetado (μL)

V_u = volume da amostra injetada (μL)

A_A = Área da amostra (uA)

A_P = Área do padrão (uA)

m = massa pesada da amostra (g)

V_f = volume final obtido para injeção no cromatógrafo (mL)

V_{ex} = volume da solução de extração (mL)

V_{R1} = volume utilizado (mL) do extrato (V_{ex})

V_{R2} = volume obtido após ressuspensão de V_{R1} para injeção na cromatografia de permeação de gel (mL)

V_{R3} = volume injetado na cromatografia de permeação de gel (mL)

3.5.6 Pesticidas a serem estudados, (ANVISA, 2004);

Permetrina

a) Ingrediente ativo ou nome comum: PERMETRINA

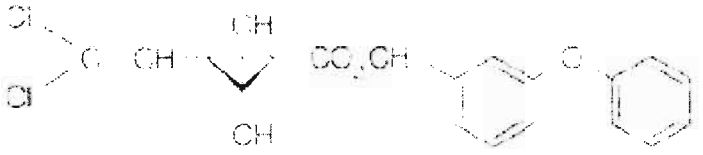
b) Sinonímia: MP 79; NIA-33297; WL 43479; PP557

c) Nº CAS: 52645-53-1

d) Nome químico: 3-fenoxibenzil (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanecarboxilato

e) Fórmula bruta: $C_{21}H_{20}Cl_2O_3$

f) Fórmula estrutural:



g) Grupo químico: Piretróide

h) Classe: Inseticida

i) Classificação toxicológica: Classe III

j) Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de algodão, arroz, café, couve, couve-flor, fumo, milho, repolho, soja, tomate e trigo.

Aplicação em arroz, fumo, milho e trigo armazenado.

Aplicação no controle de formigas, conforme aprovação em rótulo e bula.

Deltametrina

a) Ingrediente ativo ou nome comum: DELTAMETRINA

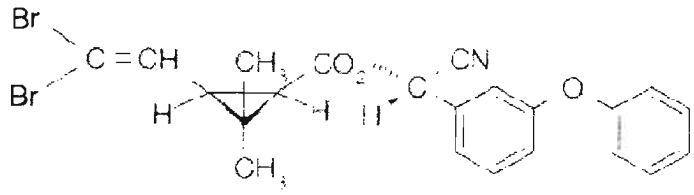
b) Sinonímia: NRDC 161; RU-22974

c) N° CAS: 52918-63-5

d) Nome químico: (S)-a-ciano-3-fenoxibenzil (1R,3R) -3-(2,2-dibromovinil)- 2,2-dimetilciclopropanecarboxilato

e) Fórmula bruta: $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$

f) Fórmula estrutural:



g) Grupo químico: Piretróide

h) Classe: Inseticida

i) Classificação toxicológica: Classe III

j) Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de abacaxi, algodão, alho, ameixa, amendoim, arroz, batata, berinjela, brócolis, cacau, café, caju, cebola, citros, couve, couve-flor, crisântemo, eucalipto, feijão, feijão-vagem, figo, fumo, gladíolo, maçã, melancia, melão, milho, pastagem, pepino, pêssego, pimentão, repolho, seringueira, soja, sorgo, tomate e trigo.

Aplicação em amendoim, arroz, cacau, café, cevada, feijão, milho, soja e trigo armazenados.

Aplicação no controle de formigas, conforme aprovação em rótulo e bula

Fenvalerato

a) Ingrediente ativo ou nome comum: FENVALERATO

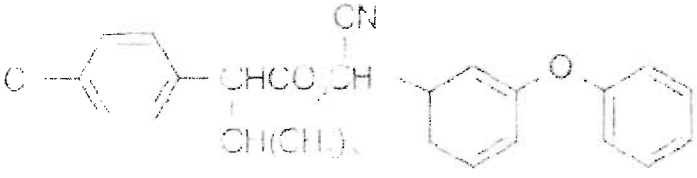
b) Sinonímia: SD 43775

c) Nº CAS: 51630-58-1

d) Nome químico: (RS)-a-ciano-3-fenoxibenzil (RS)-2-(4-cloro fenil)-3-metilbutirato

e) Fórmula bruta: $C_{25}H_{22}ClNO_3$

f) Fórmula estrutural:



g) Grupo químico: Piretróide

h) Classe: Inseticida e acaricida

i) Classificação toxicológica: Classe II

j) Emprego domissanitário

Cipermetrina

a) Ingrediente ativo ou nome comum: CIPERMETRINA

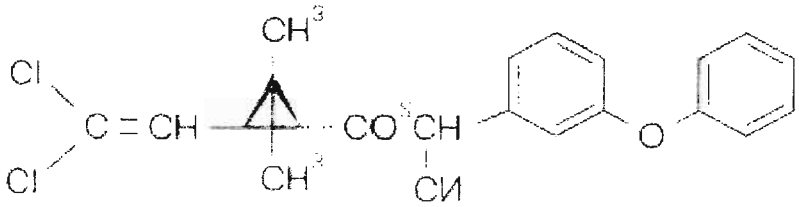
b) Sinonímia: WL 85871

c) Nº CAS: 52315-07-8

d) Nome químico: (RS)-a-ciano-3-fenoxibenzil (1RS,3RS; 1RS,3SR)-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropane carboxilato

e) Fórmula bruta: $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$

f) Fórmula estrutural:



g) Grupo químico: Piretróide

h) Classe: Inseticida

i) Classificação toxicológica: Classe II

j) Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de algodão, amendoim, arroz, batata, café, cebola, ervilha, feijão, feijão-vagem, fumo, melancia, milho, pepino, repolho, soja e tomate.

Aplicação no solo na cultura de fumo.

Fenpropatrina

a) Ingrediente ativo ou nome comum: FENPROPATRINA

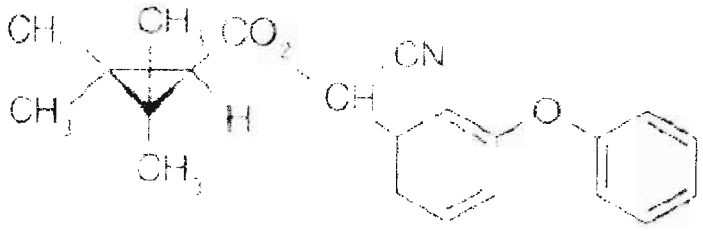
b) Sinonímia: S-3206

c) Nº CAS: 39515-41-8

d) Nome químico: (RS)-alfa -ciano-3-fenoxibenzil 2,2,3,3-tetrametilciclopropanecarboxilato

e) Fórmula bruta: $C_{22}H_{23}NO_3$

f) Fórmula estrutural:



g) Grupo químico: Piretróide

h) Classe: Inseticida e acaricida

i) Classificação toxicológica: Classe II

j) Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de algodão, café, cebola, citros, crisântemo, feijão, gladíolo, maçã, mamão, milho, morango, repolho, rosa, soja e tomate.

Lambda-Cialotrina

a) Ingrediente ativo ou nome comum: LAMBDA-CIALOTRINA

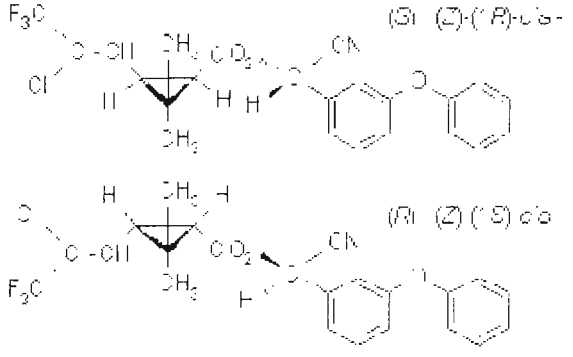
b) Sinonímia: Cyhalothrin; Cyhalothrin K; Clocythrin; PP 321

c) Nº CAS: 91465-08-6

d) Nome químico: (S)-a-ciano-3-fenoxibenzil (Z)-(1R,3R)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoro prop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropanecarboxilato e (R)-aciano-3-fenoxibenzil(Z)-(1S,3S)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop -1-enil)-2,2-dimetilciclopropanecarboxilato

e) Fórmula bruta: $C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$

f) Fórmula estrutural:



g) Grupo químico: Piretróide

h) Classe: Inseticida

i) Classificação toxicológica: Classe III

j) Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de algodão, amendoim, arroz, batata, café, cebola, citros, couve, feijão, fumo, milho, soja, tomate e trigo.

Bifentrina

a) Ingrediente ativo ou nome comum: BIFENTRINA

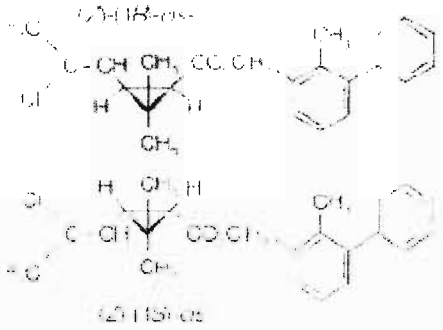
b) Sinonímia: -

c) Nº CAS: 82657-04-3

d) Nome Químico: 2-metilbifenil-3-ilmetil (Z)-(1RS,3RS)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropane carboxilato

e) Fórmula bruta: $C_{23}H_{22}ClF_3O_2$

f) Fórmula estrutural:



g) Grupo químico: Piretróide

h) Classe: Inseticida e acaricida

i) Classificação toxicológica: Classe II

j) Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de algodão, citros, couve, crisântemo, feijão, fumo, manga, mamão, melão, pepino, rosa soja, tomate e uva.

Aplicação em arroz, milho e trigo armazenado.

Aplicação no solo na cultura de cana-de-açúcar.

Aplicação no controle de formigas, conforme aprovação em rótulo e bula.

3.5.7 Amostras analisadas

A amostra usada para os estudos de validação não recebeu aplicação de nenhum pesticida. Antes do inicio dos estudos a amostra foi analisada pelo método DFG-S19 (DFG, 1997) com a utilização da técnica de cromatografia a gás com detector de captura de elétrons (GC-ECD). Nestes experimentos não foi detectado nenhum resíduo de pesticida piretróide.

Foram analisadas 48 amostras de feijão que foram adquiridas no comércio varejista da cidade de São Paulo durante o ano de 2005, coletadas aleatoriamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultura Estudada

Os critérios para a escolha da cultura estudada seguiram dois princípios:

- As culturas mais sujeitas à aplicação de pesticidas piretróides,
- A maior porcentagem de comercialização destas culturas no país.

Desta forma foi escolhido o feijão para ser estudado, pois além do grande consumo deste produto pelos brasileiros, ele também apresenta registro para a maioria os piretróides estudados, conforme é mostrado na Tabela 6, com apresentação da modalidade de emprego, o limite máximo de resíduo e o intervalo de segurança.

Tabela 6 – Limites máximos de resíduo permitido dos piretróides estudados, na cultura de feijão (ANVISA, 2004).

Pesticida Piretróide	Modalidade de emprego *	LMR** (mg/kg)	Intervalo de segurança
Permetrina		Sem registro	
Cipermetrina	foliar	0,05	14 dias
Fenvalerato		Sem registro	
Fenpropatrina	foliar	0,01	14 dias
Deltametrina	foliar	0,2	16 dias
	armazenado	0,2	30 dias
Lambda-cialotrina	foliar	0,05	15 dias
Bifentrina	foliar	0,02	20 dias

*Limite Máximo de Resíduo Permitido

4.2 Otimização das Condições Cromatográficas

4.2.1 Comprimento de onda do detector UV-Visível

Os comprimentos de onda utilizados para a quantificação dos piretróides foram determinados a partir dos espectros de absorção molecular na região do UV-vis obtidos com um espectrofotômetro entre 190 até 400 ηm, com os padrões em solução de acetonitrila:água (8:2) com aproximadamente 1,0 ηg/μL de concentração. O comprimento de onda que apresentou maior absorção para a maioria dos piretróides foi o 208 ηm. Porém em 208 ηm o cromatograma apresenta uma grande variação da linha de base, o que dificulta a determinação dos piretróides. Portanto, foram feitas injeções no cromatógrafo de um coquetel de piretróides em diferentes comprimentos de onda entre 208 a 215 ηm, obtendo melhor resultado em 212 ηm, e este foi o comprimento de onda escolhido para a utilização no método.

4.2.2 Fase Estacionária

Através de um levantamento bibliográfico, se observou que na maioria dos métodos empregados para análise de piretróides por HPLC, se utiliza fase estacionária do tipo reversa, em especial colunas C18. Devido também à disponibilidade, foi utilizada a coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 μm) 250 x 4 mm, do fabricante Merck®.

4.2.3 Fase Móvel

Também de acordo com o levantamento bibliográfico, quando se utiliza coluna C18 a fase móvel mais empregada é a mistura de acetonitrila : água, ou metanol : água.

Foram realizados testes com a mistura metanol : água, porém, devido ao comprimento de onda utilizado ser muito baixo, a variação da linha de base (ruído), quando se utiliza esta fase móvel é muito alta, o que atrapalha na identificação do piretróides.

Optou-se então pela mistura acetonitrila : água e estudada a composição da mistura. Foi observada a separação e a apresentação dos picos variando a composição nas seguintes proporções:

ACN:H_2O (70:30), ACN:H_2O (75:25), ACN:H_2O (80:20) e ACN:H_2O (85:25)

Observou-se que a composição (80:20) era a que apresentava melhor resultado na resolução dos picos, decidiu-se manter esta composição

4.2.4 Fluxo da fase móvel

Os estudos da composição da fase móvel foram realizados com fluxo de 1 mL/min e, após ter sido escolhida a melhor composição, foi feito um estudo do melhor fluxo. Os fluxos estudados, injetando-se o coquetel de piretróides, foram os seguintes:

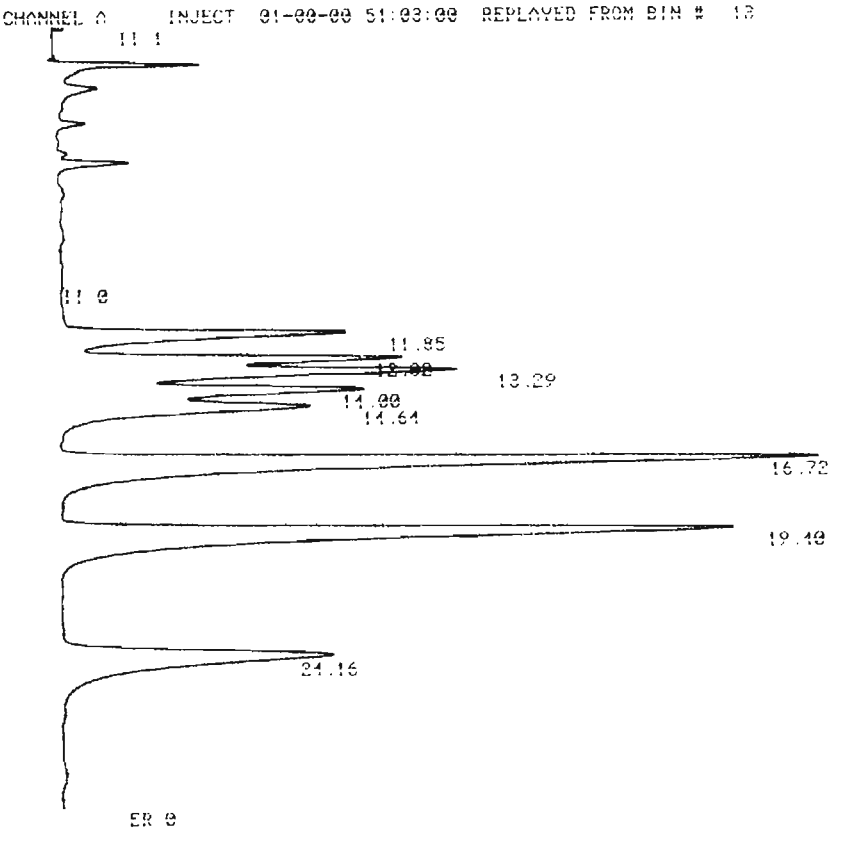
BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

0.5 mL/min	1.0 mL/min
0.6 mL/min	1.1 mL/min
0.7 mL/min	1.3 mL/min
0.8 mL/min	1.5 mL/min

Em todos os fluxos o coquetel de piretróides apresentou o mesmo perfil, ou seja, apareceram 7 picos característicos. O fluxo escolhido foi o 0,8 mL/min, visto que apresentou melhor separação e um tempo não muito longo de corrida.

Porém, mesmo depois de se otimizar as condições da fase móvel e do fluxo, para alguns picos a resolução não era adequada para conduzir uma boa determinação quantitativa, ou seja, superior a 1,5 (Mc MASTER, 1994). Optou-se em separar os piretróides em dois grupos e desta forma obteve-se uma resolução ideal adequando a separação dos picos para não prejudicar a determinação quantitativa.

A Figura 1 apresenta o cromatograma antes da separação dos piretróides em dois grupos, onde se observa uma baixa resolução dos picos, o que não prejudica a determinação qualitativa visto que os tempos de retenção de cada piretróide são bem definidos, no entanto a determinação quantitativa fica prejudicada, em especial para a quantificação de cipermetrina na presença de lambda-cialotrina e vice-versa, lambda-cialotrina na presença de deltametrina e vice-versa e de deltametrina na presença de fenvalerato e vice-versa. As Figuras 2 e 3 mostram os piretróides separados em dois grupos Figura 2 (Coq. P1) fenpropatrina, cipermetrina, fenvalerato e bifentrina e na Figura 3 (Coq. P2), lambda–cialotrina, deltametrina, trans-permetrina e cis-permetrina, estes apresentam uma resolução segura para a determinação quantitativa.

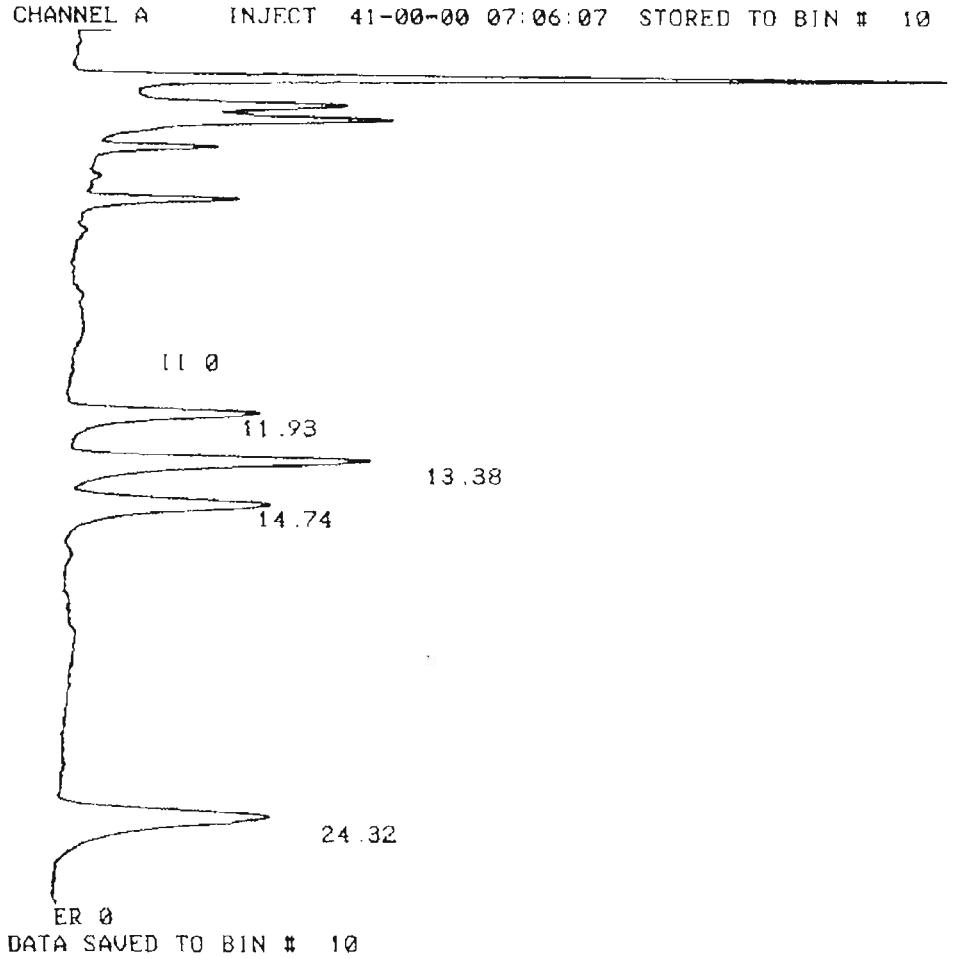


PIRETROIDES 01-00-00 51:03:00 CH# "A" PS# 1

FILE 1. METHOD 0. RUN 15 INDEX 15 BIN 13

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	7.669	11.85	395180	62
2	4.343	12.82	223766	62
3	5.609	13.29	289022	62
4	4.348	14.	224019	62
5	2.86	14.64	147387	63
6	30.099	16.72	1550871	61
7	30.331	19.4	1562873	61
8	14.743	24.16	759652	61
TOTAL	100.		5152769	

Figura 1 – Cromatograma com todos os piretróides juntos em uma mesma solução.

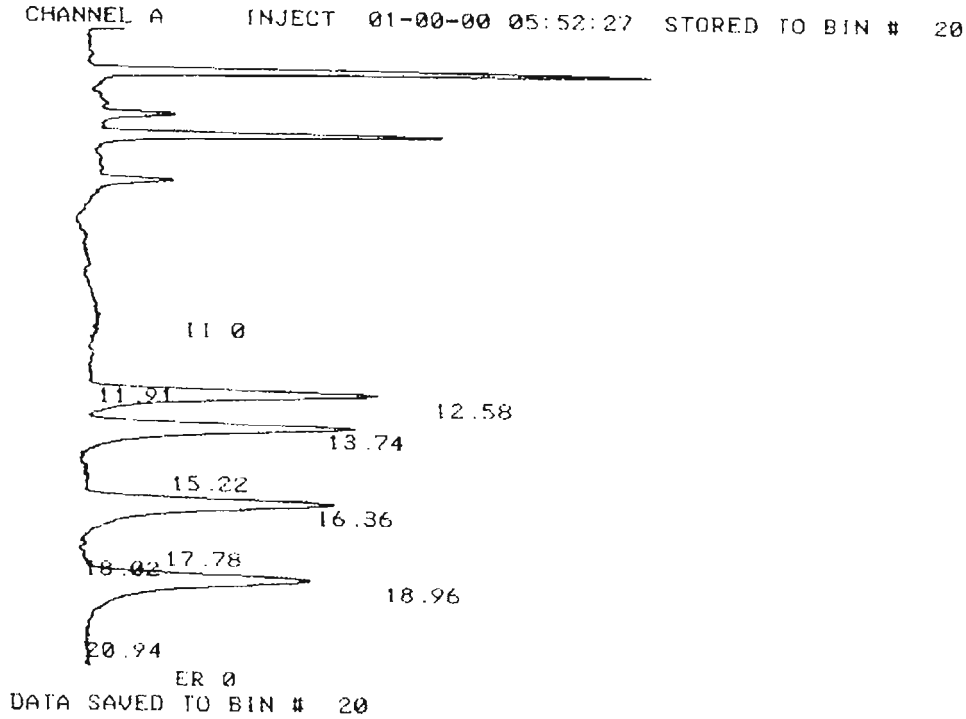


PIRETROIDES 41-00-00 07:06:07 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 10 INDEX 10 BIN 10

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	16.01	11.93	107591	61
2	28.847	13.38	193867	62
3	21.873	14.74	146998	63
4	33.27	24.32	223588	61
TOTAL	100.		672044	

Figura 2 – Cromatograma da Solução Coq. P1, fenpropatrina, cipermetrina, fenvalerato e bifentrina.



PIRETROIDES 01-00-00 05:53:27 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 21 INDEX 21 BIN 20

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	23.194	12.58	172421 62
2	23.916	13.74	177794 09
3	25.23	16.36	187558 09
4	27.66	18.96	205625 09
TOTAL	100		743398

Figura 3 – Cromatograma da Solução Coq. P2, lambda–cialotrina, deltametrina, trans-permetrina e cis-permetrina.

As Tabelas 7 e 8 apresentam as resoluções calculadas para cada pico nos cromatogramas das Figuras 2 e 3. A resolução foi maior que 1,5 para todos os picos e desta forma é possível à determinação quantitativa para todos os piretróides desde que não estejam presentes as seguintes combinações de piretróides em uma mesma amostra: cipermetrina na presença de lambda-cialotrina, lambda-cialotrina na presença de deltametrina e deltametrina na presença de fenvalerato.

Tabela 7 – Valores de resolução dos picos para solução CoqP-1 0,02 ng/µL

Piretróides	Resolução
Fenpropatrina/Lambda-cialotrina	1,6
Lambda-cialotrina/Fenvalerato	1,5
Fenvalerato/Bifentrina	8,5

Tabela 8 – Valores de resolução dos picos para solução CoqP-2 0.02 ng/µL

Piretróides	Rs
Cipermetrina/Deltametrina	2,0
Deltametrina/Cis-permetrina	3,7
Cis-permetrina/Trans-permetrina	3,3

4.2.5 Condições do integrador

As condições do integrador foram estabelecidas para que se tenha uma melhor visualização do cromatograma e repetitividade na integração dos picos. As condições são as apresentadas no Item 3.5.5.

4.3 Linearidade, faixa e função de resposta

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em faixa analítica especificada. Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico de calibração (BRITO et al, 2003).

Foram feitas curvas analíticas de calibração para cada piretróide entre as concentrações de 0,02 a 2,00 ng/µL, cobrindo toda a faixa de resposta obtida nos três níveis de fortificação estudados. As Figuras 4, 5, 6 ,7 ,8 ,9 10 e 11 apresentam as curvas obtidas a partir de 3 injeções consecutivas de 8 concentrações de soluções-padrão injetadas em ordem crescente de suas concentrações.

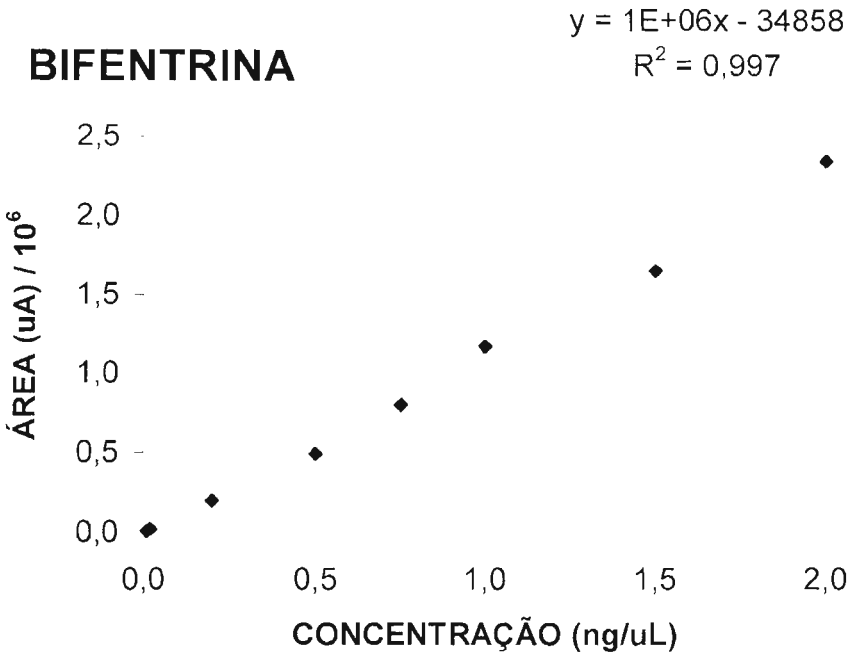


Figura 4 – Curva analítica de calibração da bifentrina.

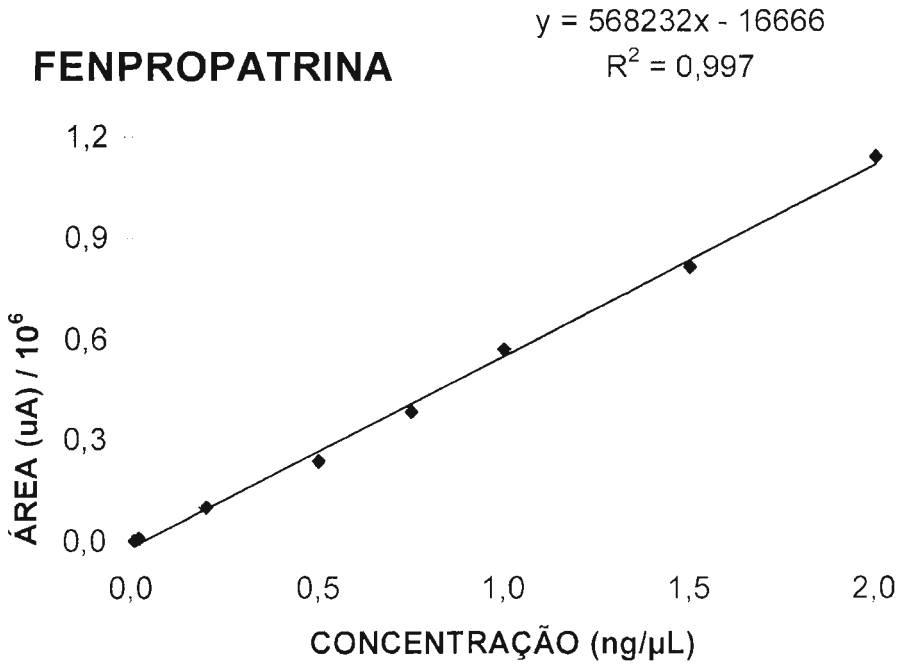


Figura 5 – Curva analítica de calibração da fenpropatrina.

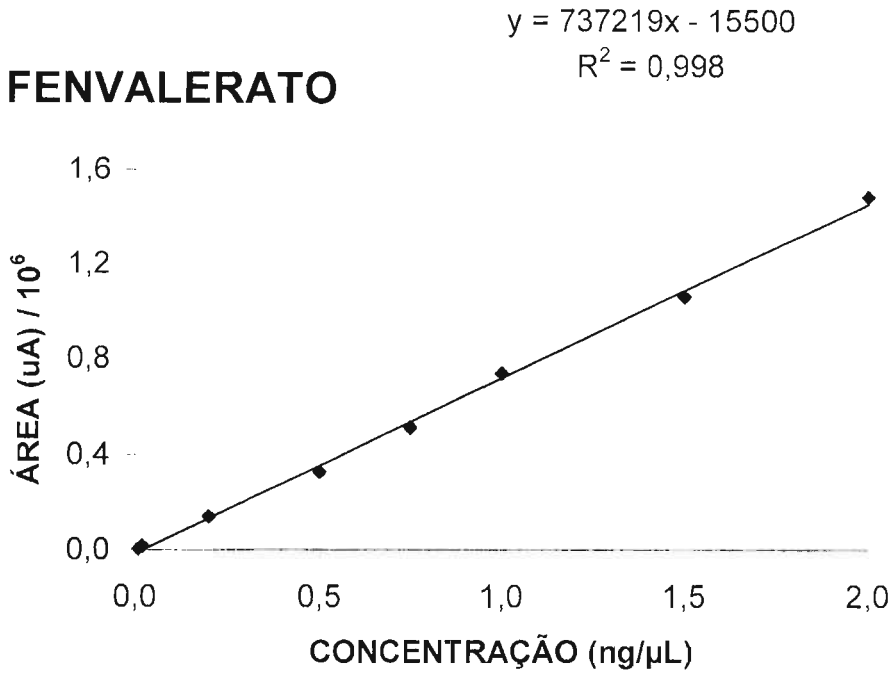


Figura 6 – Curva analítica de calibração do fenvalerato.

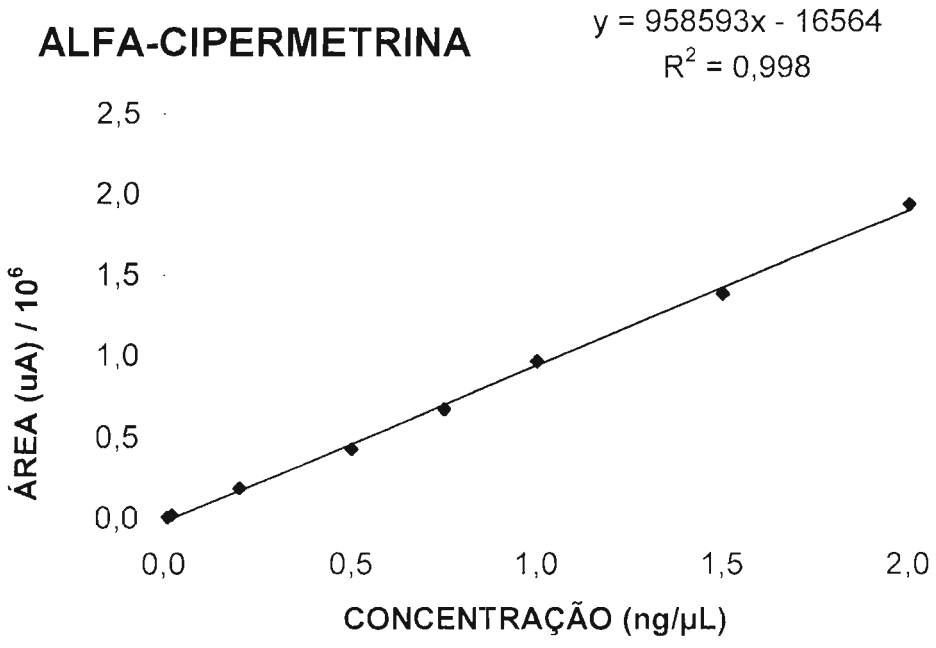


Figura 7 – Curva analítica de calibração da cipermetrina.

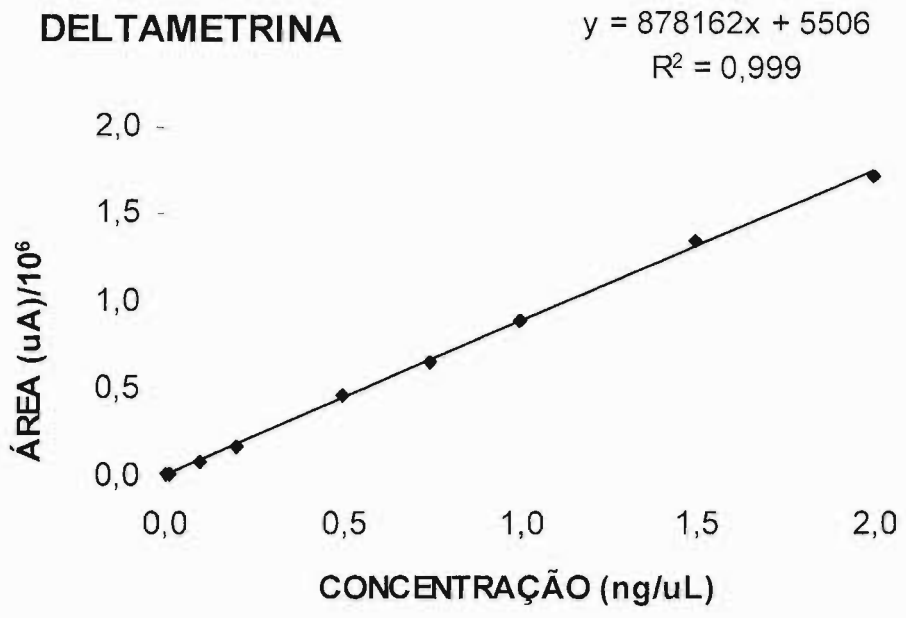


Figura 8 – Curva analítica de calibração da deltametrina.

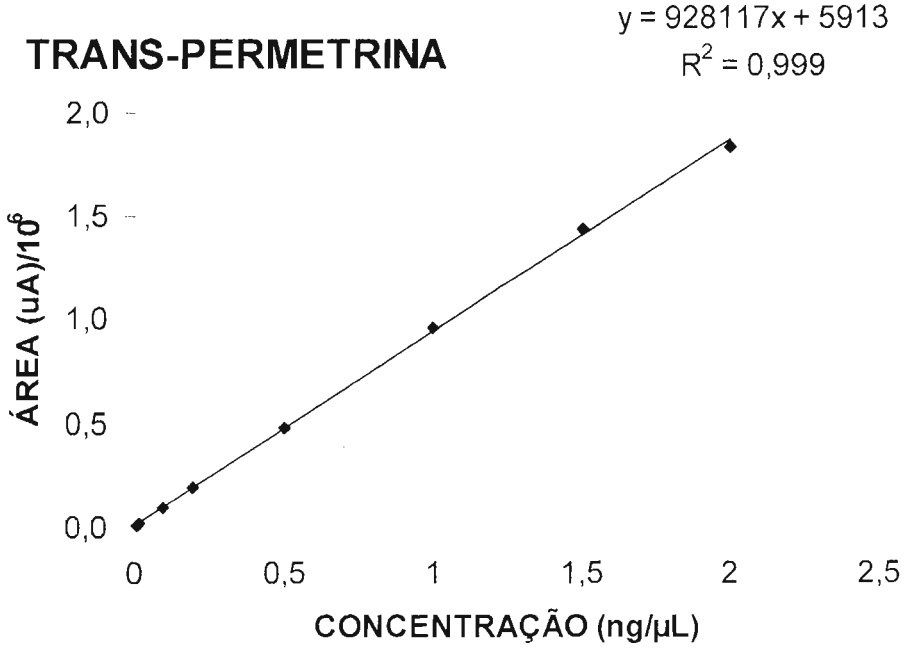


Figura 9 – Curva analítica de calibração da trans-permetrina.

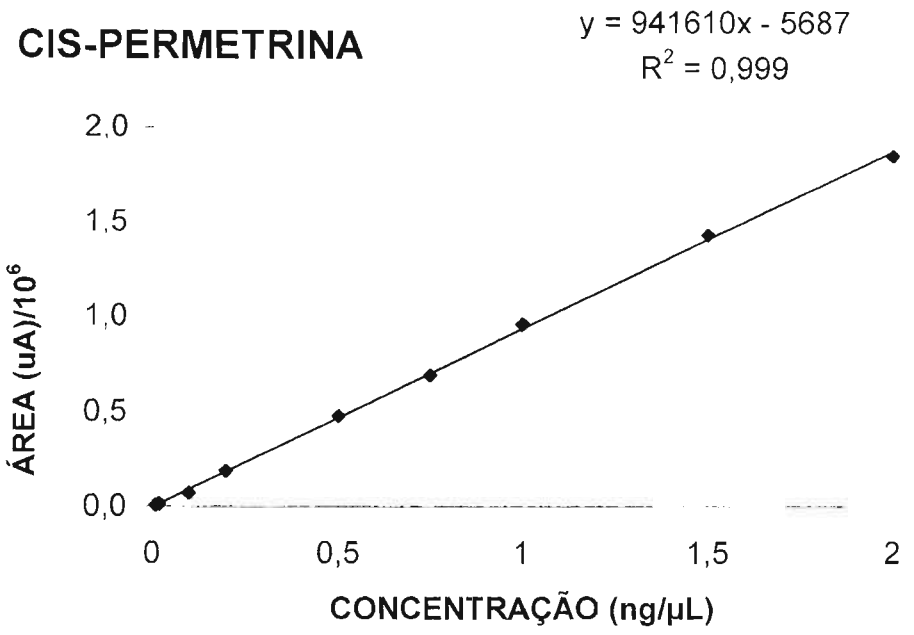


Figura 10 – Curva analítica de calibração da cis-permetrina.

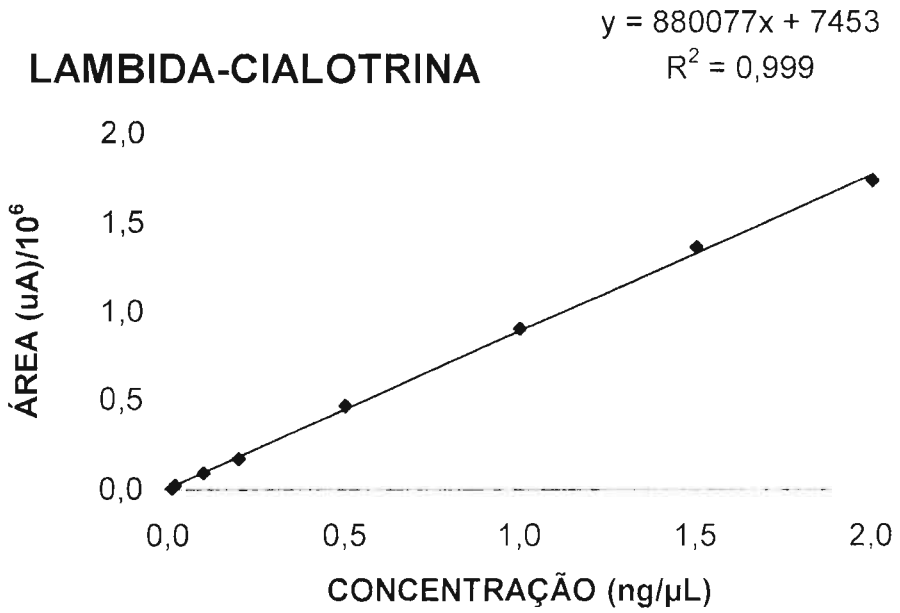


Figura 11 – Curva analítica de calibração da lambda-cialotrina.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Podemos observar na Tabela 9 que todos os piretróides apresentaram bons coeficientes de correlação, demonstrando uma boa linearidade de resposta nas condições cromatográficas especificadas, o que demonstra a habilidade do método em obter os resultados de teste, proporcionais a concentração dos piretróides estudados, na faixa de trabalho pretendida.

Tabela 9 - Dados da equação linear e coeficiente de correlação das curvas analíticas de calibração.

Piretróide	A / 10^4	δ / 10^4	B / 10^4	δ / 10^4	r^2
Bifentrina	-3	3	116	3	0,997
Fenpropatrina	-2	1	57	1	0,997
Fenvalerato	-2	1	74	1	0,998
Cipermetrina	-2	1,7	96	2	0,998
Deltametrina	0,6	1	88	1	0,999
Trans-Permetrina	0,6	0,9	93	1	0,999
Cis-Permetrina	-0,6	0,9	94	1	0,999
Lambda-Cialotrina	0,7	2	88	2	0,999

Nota: Y = a+ bx, A = coeficiente linear, B = coeficiente angular, δ = desvio padrão
r^2 = coeficiente de correlação.

4.4 Discussão do Desenvolvimento da metodologia de extração e purificação da amostra:

4.4.1 Extração

A técnica de extração utilizada foi a mesma utilizada no método DFG-S19 (DFG, 1997) com modificações, (SPECHT, 1995) sendo utilizados apenas 100 mL de acetona em 20 g de amostra. (Descrito em 3.5.1.)

4.4.2 Partição

A técnica de partição também foi a mesma utilizada no método DFG-S19 com modificações (SPECHT, 1995), porém utilizando apenas 50 mL de acetato de etila : ciclohenxano (1:1) (Descrito em 3.5.2.)

4.4.3 Purificação

A técnica de purificação estudada foi a cromatografia de permeação em gel (GPC) também utilizada no método DFG-S19 com modificações (SPECHT, 1995) (Descrito em 3.5.3.).

Os testes preliminares mostraram que esta técnica proporcionava a purificação adequada da amostra testemunha, o que foi posteriormente confirmado em testes com amostras fortificadas. Observou-se uma boa recuperação nos testes preliminares, de modo que a validação da metodologia foi realizada utilizando esta técnica de purificação.

4.5 Validação do método

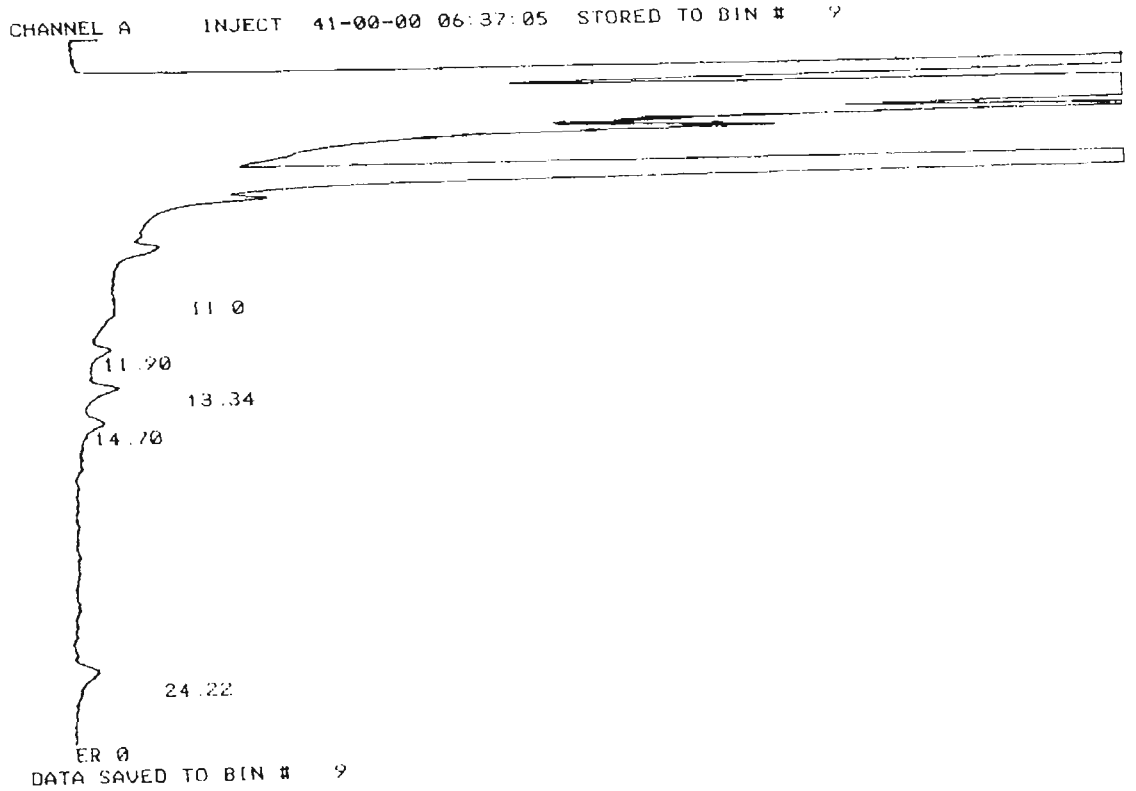
O método foi validado em três níveis de fortificações diferentes, 0,01 mg/kg, 0,10 mg/kg e 1,0 mg/kg.

Os piretróides apresentam vários isômeros, e estes muitas vezes são de difícil separação quando são sintetizados. A cromatografia liquida de fase reversa nos revelou uma ótima possibilidade de análise dos piretróides por apresentarem, na forma que foi realizada, a separação da maioria dos produtos, apresentando apenas um pico característico da molécula, com exceção da permetrina que apresentou suas formas CIS e TRANS.

Todo o processo de validação e apresentação dos resultados foi feito calculando as concentrações dos isômeros da permetrina separadamente. Portanto, os resultados para a permetrina foram calculados para as suas formas cis e trans.

Outra modificação necessária para a validação do método foi a necessidade de separar os piretróides em dois grupos, intercalando os tempos de retenção, isto aconteceu, como já discutido em 5.3.3., devido a baixa resolução dos picos, o que prejudica a determinação quantitativa.

Os cromatogramas nos três níveis de fortificação estudados são mostrados nas Figuras 12, 13, 14, 15, 16 e 17.



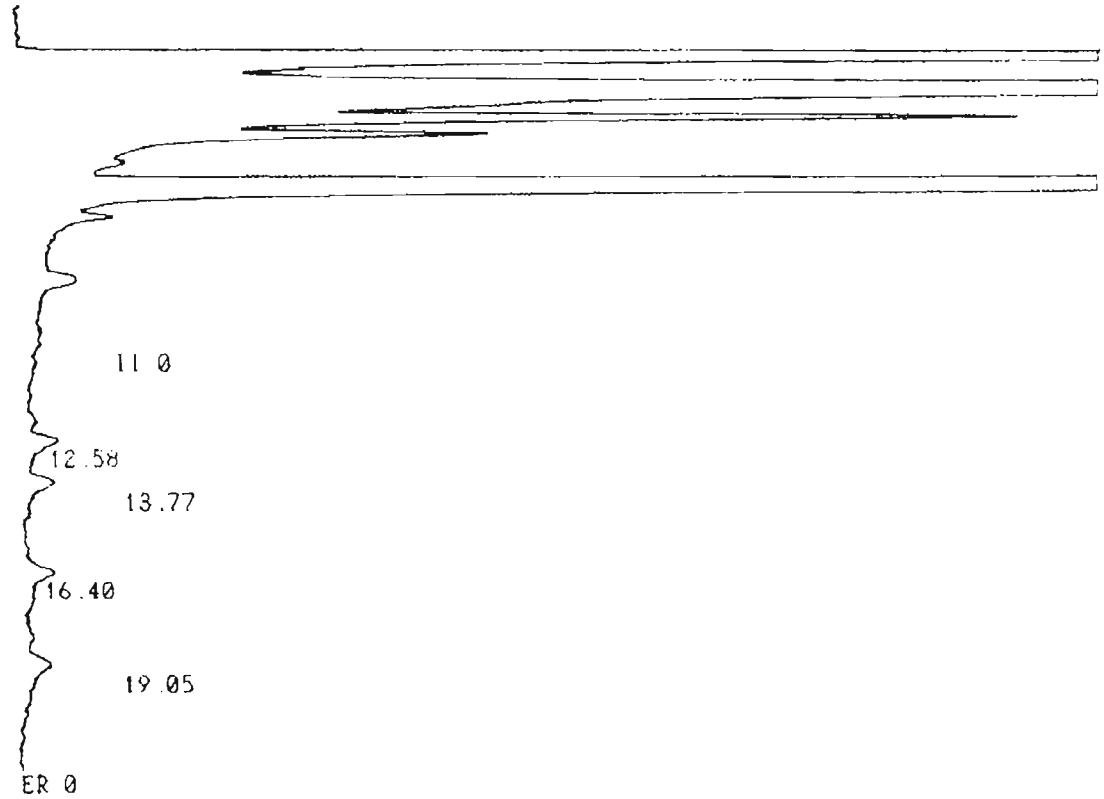
PIRETROIDES 41-00-00 06:37:05 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 9 INDEX 9 BIN 9

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	16.258	11.9	10691	61
2	31.313	13.34	20591	61
3	18.164	14.7	11944	61
4	34.265	24.22	22532	61
TOTAL	100		65758	

Figura 12 – Cromatograma de amostra fortificada em 0,01 mg/kg com o Coq P1.

CHANNEL A INJECT 00-00-00 06:32:44 STORED TO BIN # 7



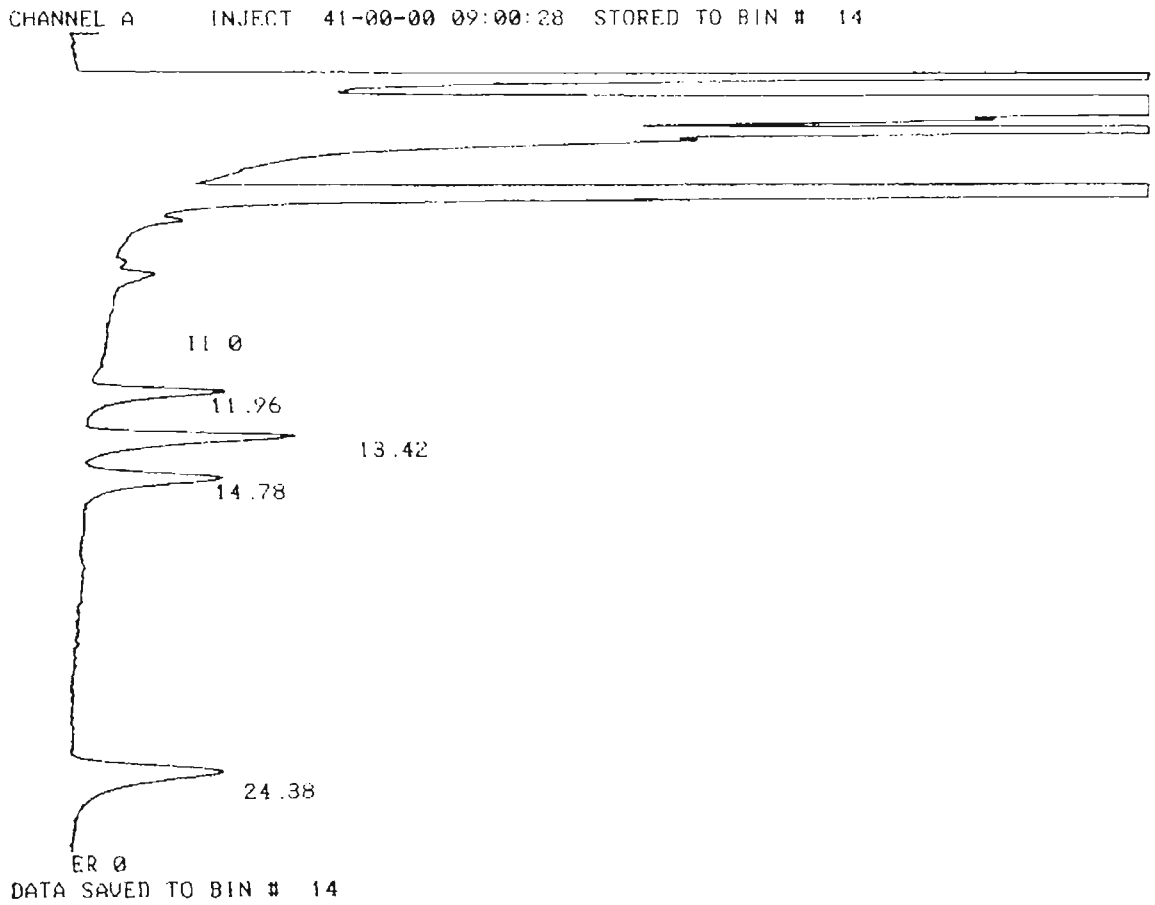
DATA SAVED TO BIN # 7

PIRETROIDES 00-00-00 06:32:44 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 7 INDEX 7 BIN 7

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	28.156	12.58	16481	61
2	24.081	13.77	14096	61
3	24.742	16.4	14483	61
4	23.02	19.05	13475	61
TOTAL	100.		58535	

Figura 13 – Cromatograma de amostra fortificada em 0,01 mg/kg com o Coq P2.

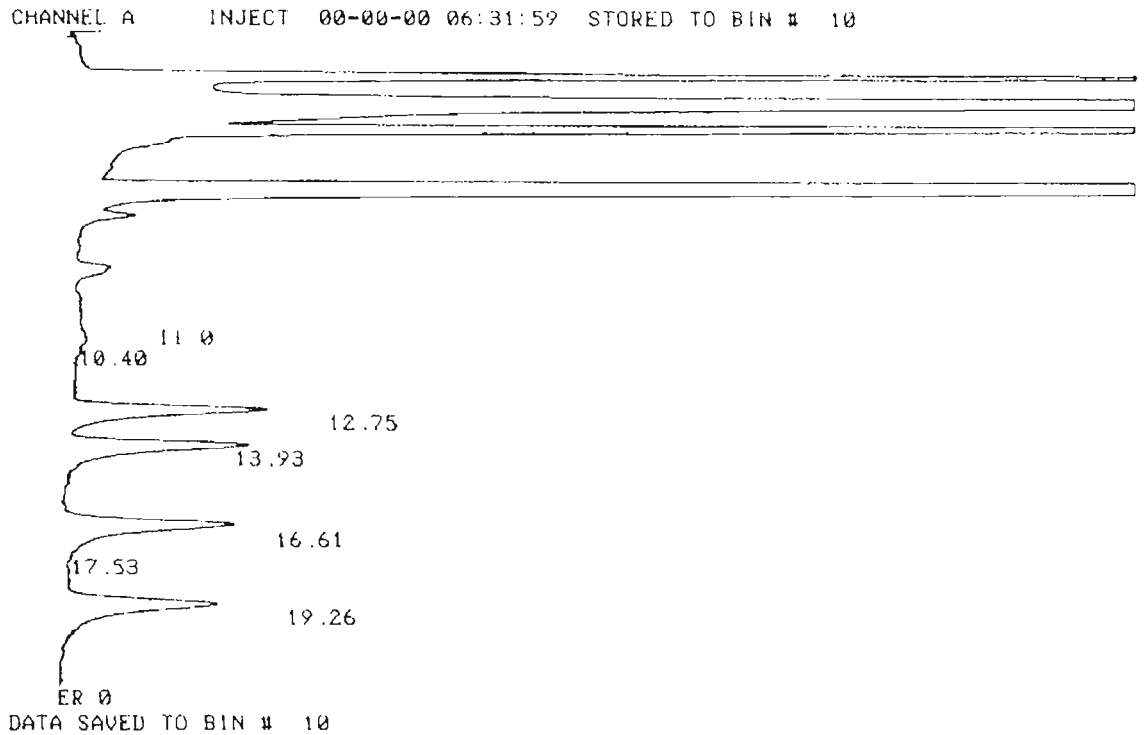


PIRETROIDES 41-00-00 09:00:28 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 14 INDEX 14 BIN 14

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	15.766	11.96	80279	61
2	28.713	13.42	146205	62
3	21.365	14.78	108790	63
4	34.155	24.38	173915	61
TOTAL	100.		509189	

Figura 14 – Cromatograma de amostra fortificada em 0,10 mg/kg com o Coq P1.

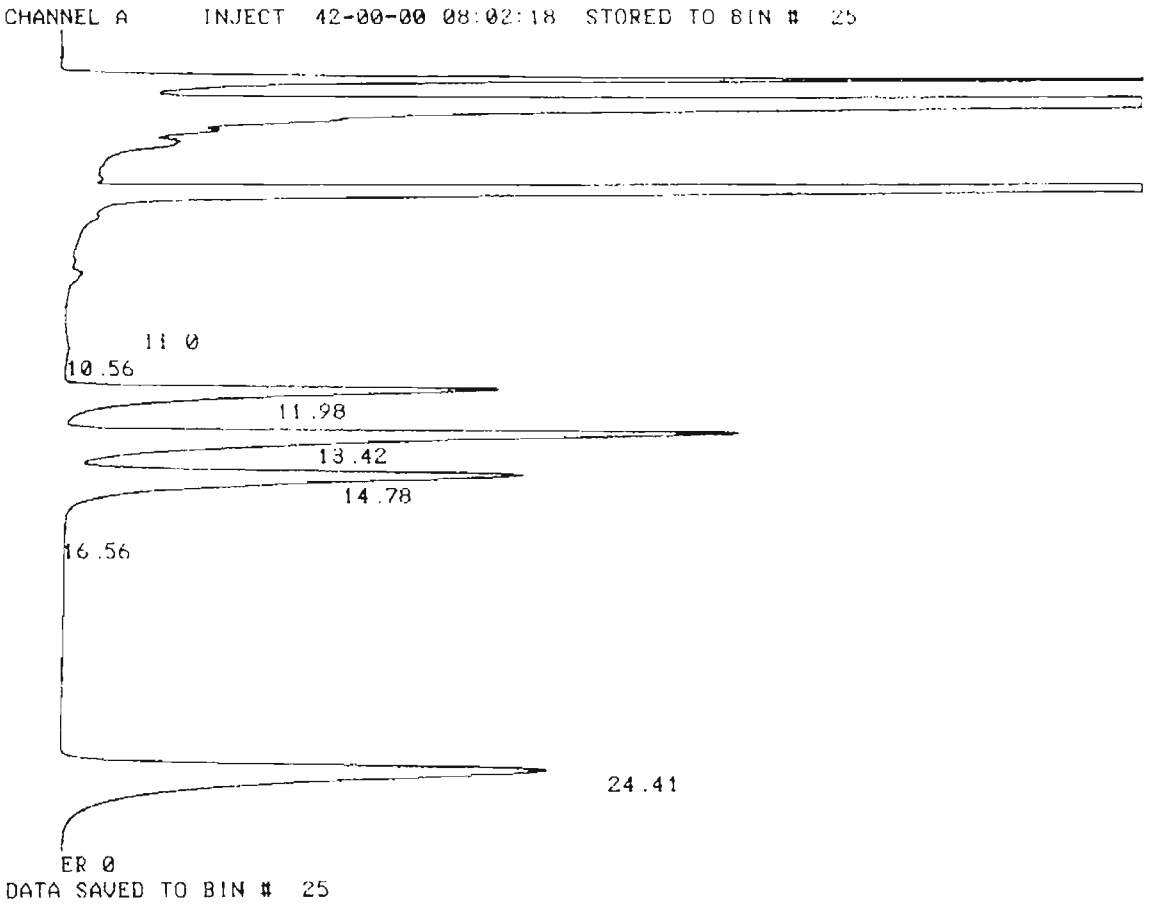


PIRETROIDES 00-00-00 06:31:59 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 10 INDEX 10 BIN 10

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	1.342	10.4	7068	61
2	24.56	12.75	129370	62
3	24.479	13.93	128943	63
4	23.785	16.61	125289	63
5	25.834	19.26	136079	61
TOTAL	100.		526749	

Figura 15 – Cromatograma de amostra fortificada em 0,10 mg/kg com o Coq P2.

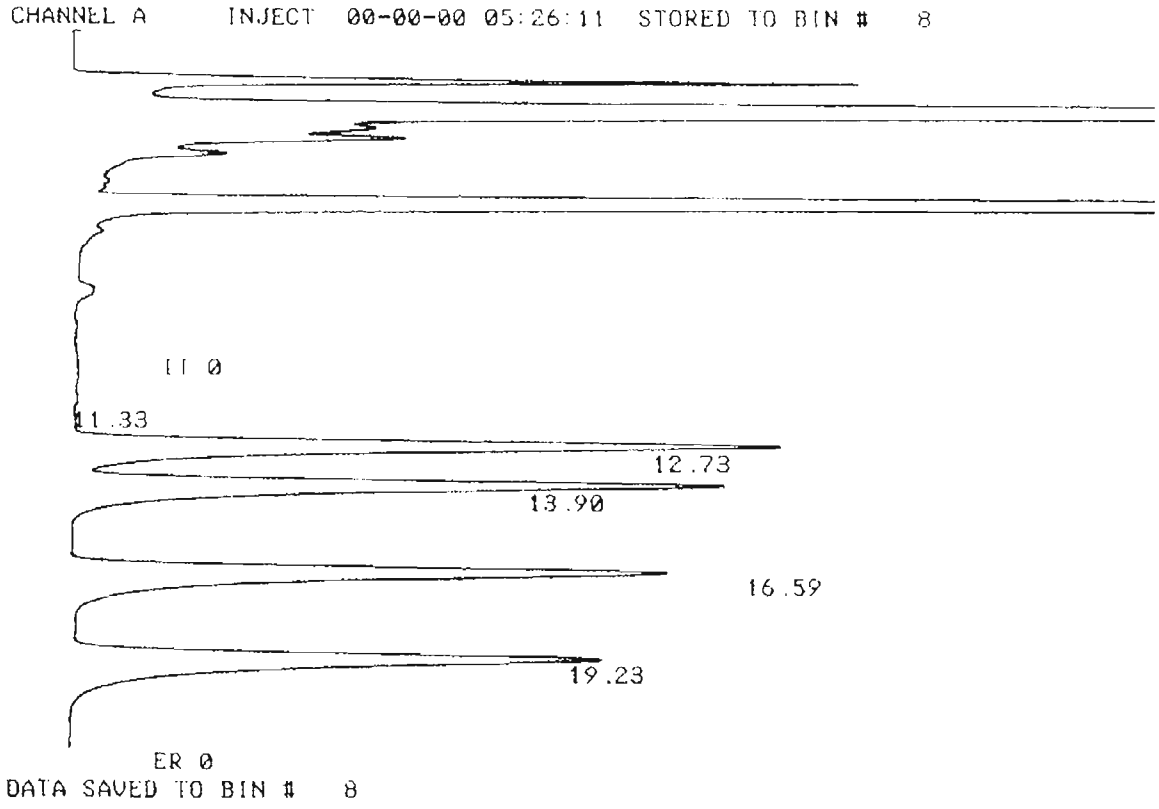


PIRETROIDES 42-00-00 08:02:18 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 25 INDEX 25 BIN 25

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.232	10.56	15608	62
2	13.161	11.98	884507	08
3	29.198	13.42	1962277	66
4	23.429	14.78	1574568	66
5	0.023	16.56	1551	67
6	33.957	24.41	2282103	61
TOTAL	100		6720614	

Figura 16 – Cromatograma de amostra fortificada em 1,00 mg/kg com o Coq P1.



PIRETROIDES 00-00-00 05:27:11 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 9 INDEX 9 BIN 8

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	24.266	12.73	1680870	62
2	23.898	13.9	1655318	63
3	25.787	16.59	1786220	61
4	26.049	19.23	1804329	61
TOTAL	100.		6926737	

Figura 17 – Cromatograma de amostra fortificada em 1,00 mg/kg com o Coq P2.

4.5.1 Especificidade/Seletividade

O termo especificidade, muitas vezes utilizado como sinônimo de seletividade, define a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. Enquanto a seletividade refere-se à capacidade de detecção de substâncias (BRITO et al, 2003).

A especificidade do método é demonstrada através do cromatograma da amostra testemunha, Figura 15, ou seja, amostra de feijão que não contem nenhuns dos piretróides estudados.

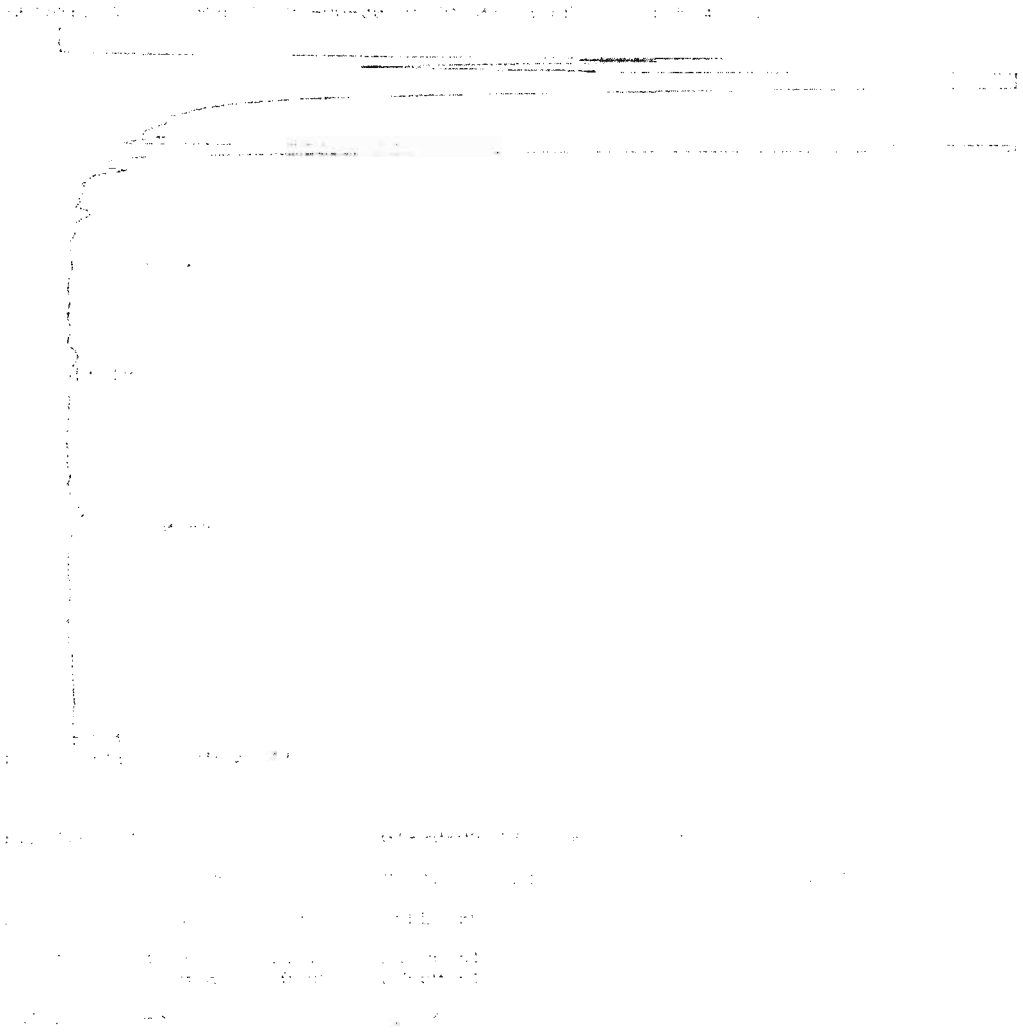


Figura 18 – Cromatograma de uma amostra testemunha de feijão.

Observa-se que na região cromatográfica onde os piretróides apresentam seus tempos de retenção (entre 11 e 24 minutos) não existe a presença de picos cromatográficos componentes da amostra que possam interferir na análise, inviabilizando a identificação e quantificação inequívoca dos piretróides estudados.

Como substâncias diferentes podem apresentar respostas similares em dadas condições deve-se proceder à verificação da especificidade, seguida por outras técnicas comprobatórias. Para se ter certeza de que os picos encontrados nos estudos de fortificação são realmente os picos característicos dos piretróides, uma amostra do estudo foi injetada em cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons, Figuras 16 a 20, comparando-se os tempos de retenção com os tempos característicos dos padrões de piretróides injetados nas mesmas condições, o que confirmou a identificação qualitativa dos piretróides feitas pelo HPLC.

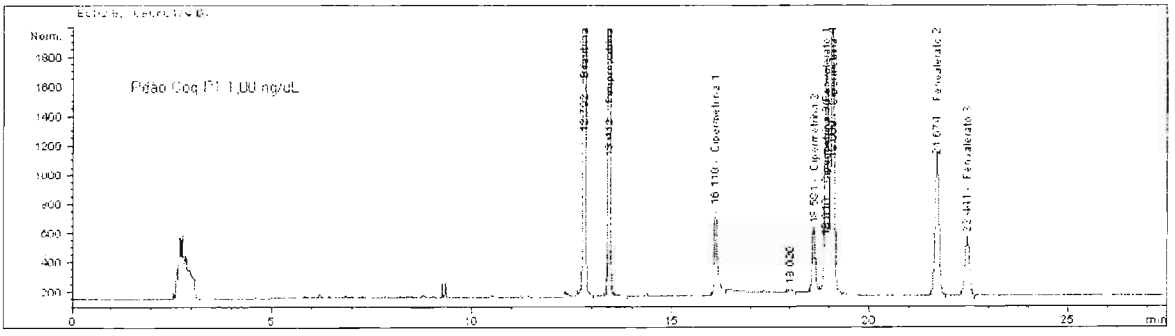


Figura 19 – Cromatograma da solução padrão Cop. P1 1,00 ηg/μL injetada no cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura de elétrons.

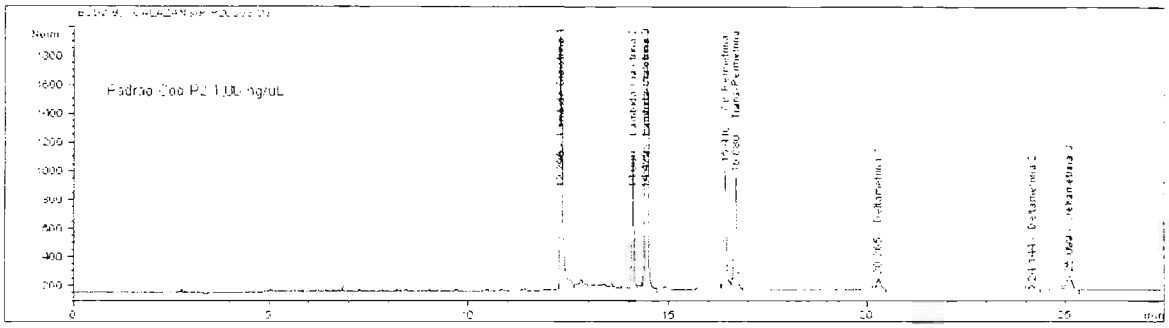


Figura 20 – Cromatograma da solução padrão Cop. P2 1,00 ηg/μL injetada no cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura de elétrons.

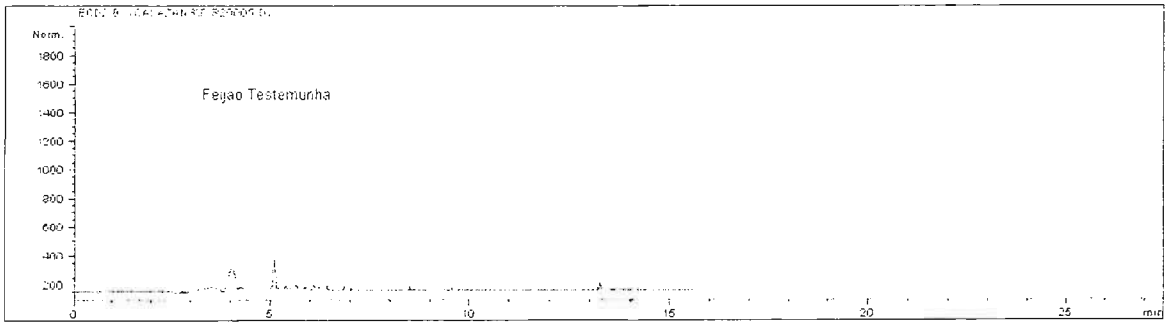


Figura 21 – Cromatograma da amostra de feijão testemunha injetada no cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura de elétrons.

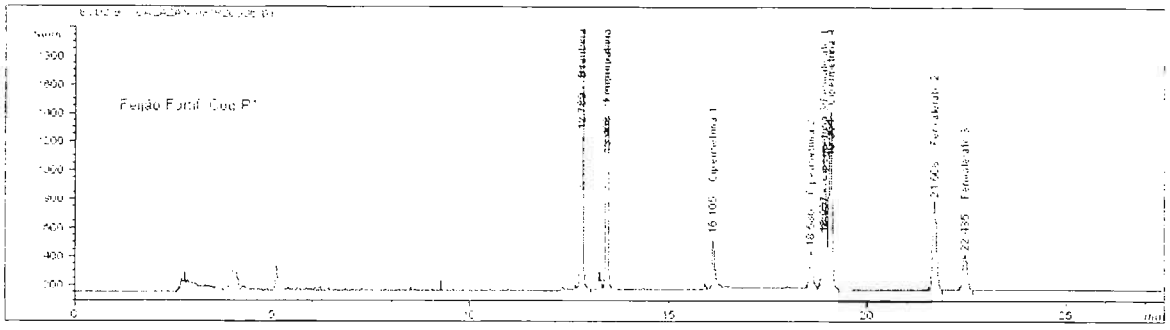


Figura 22 – Cromatograma da amostra fortificada com o Coq. P1 injetada no cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura de elétrons.

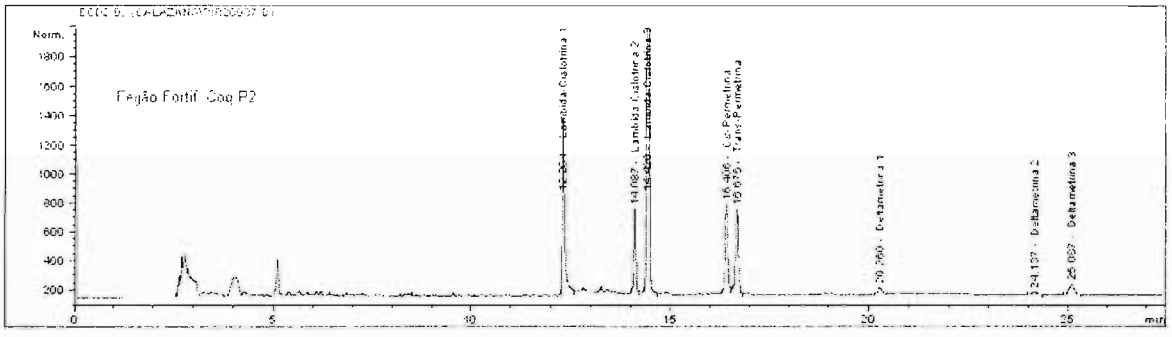


Figura 23 – Cromatograma da amostra fortificada com o Coq. P2 injetada no cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura de elétrons.

4.5.2 Recuperação

As Tabelas 10 a 19 mostram as médias das recuperações obtidas para as 7 repetições nos três diferentes níveis de fortificações estudados. As tabelas também contêm os desvios padrões e os coeficientes de variação que serão discutidos no decorrer deste tópico.

Tabela 10 – Recuperações para a Fenpropatrina

Nível de Fortificação	Média (%)	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)
0,01 mg/kg	105	12,6	12,0
0,10 mg/kg	80	2,9	3,7
1,00 mg/kg	91	12,1	13,2

Tabela 11 – Recuperações para o Fenvalerato

Nível de Fortificação	Média (%)	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)
0,01 mg/kg	97	11,4	11,8
0,10 mg/kg	79	3,7	4,7
1,00 mg/kg	100	6,1	6,1

Tabela 12 – Recuperações para a Cipermetrina

Nível de Fortificação	Média (%)	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)
0,01 mg/kg	99	8,1	8,2
0,10 mg/kg	78	1,8	2,3
1,00 mg/kg	99	1,9	1,9

Tabela 13 – Recuperações para a Deltametrina

Nível de Fortificação	Média (%)	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)
0,01 mg/kg	96	12,2	12,8
0,10 mg/kg	72	2,5	3,5
1,00 mg/kg	93	3,5	3,8

Tabela 14 – Recuperações para a Trans-permetrina

Nível de Fortificação	Média (%)	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)
0,01 mg/kg	105	13,5	12,8
0,10 mg/kg	70	6,5	9,3
1,00 mg/kg	98	1,5	1,5

Tabela 15 – Recuperações para a Cis-permetrina

Nível de Fortificação	Média (%)	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)
0,01 mg/kg	101	14,5	14,4
0,10 mg/kg	80	10,5	13,1
1,00 mg/kg	99	1,7	1,7

Tabela 16 – Recuperações para a Lambda-cialotrina

Nível de Fortificação	Média (%)	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)
0,01 mg/kg	104	11,9	11,5
0,10 mg/kg	71	2,2	3,2
1,00 mg/kg	94	2,6	2,8

Tabela 17 – Recuperações para a Bifentrina

Nível de Fortificação	Média (%)	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)
0,01 mg/kg	106	11,0	10,4
0,10 mg/kg	85	5,9	7,0
1,00 mg/kg	96	0,9	0,9

Observamos que todos os piretróides apresentaram recuperações dentro do intervalo de 70 a 120%, proposto pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA) (EPA, 1996) e pelo Codex Alimentarius (CODEX, 2000) e também estiveram de acordo com a Comissão Européia para monitoramento de resíduos de pesticidas, que propõe um intervalo de 70 a 110% (EURACHEM, 1998). Os valores de coeficientes de variação porcentual também estão de acordo com os índices propostos, de até 20 % segundo a comissão formada por membros das organizações AOAC, FAO, IAEA & IUPAC, 1999. Isto só foi possível após se ter separado os piretróides em dois grupos intercalando os tempos de retenção que apresentaram. Quando se realizou o estudo de recuperação com todos os piretróides junto o Fenvalerato e a Deltametrina não apresentaram todas as suas recuperações entre dos intervalos aceitos. Isto aconteceu devido à baixa resolução cromatográfica dos picos destes dois compostos. Podemos observar no cromatograma característico de uma amostra fortificada em 0,10 mg/kg, Figura 6, que outros compostos também apresentam baixa resolução, no entanto, as recuperações foram satisfatórias, mas não nos dá a certeza de estar quantificando de forma correta.

Após terem sido realizados estudos de fortificação com os dois grupos de compostos separados, nos três mesmos níveis de concentração das que foram feitas para o coquetel e nas mesmas condições os resultados foram todos dentro dos intervalos aceitos, o que comprova que a baixa recuperação do fenvalerato e da deltametrina nas amostras fortificadas com o coquetel foi devido a uma superposição dos picos destas moléculas, ou seja, baixa resolução cromatográfica, o que resultou em áreas não representativas dos mesmos, não podendo desta forma ser quantificado adequadamente.

4.5.3 Limite de Detecção

O limite de detecção é definido como a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas (BRITO et al, 2003). Pode ser definido também como

o menor valor detectado em confiabilidade de precisão aceitável, em função do limite do sistema (eletrônica, instrumental, ganho etc.) (LEITE, 1996).

Não há um consenso para a utilização de um único método para a determinação do limite de detecção em quantificações analíticas. O limite de detecção pode ser determinado mediante a relação sinal/ruído, o desvio padrão da resposta e do coeficiente angular e por processos estatísticos.

A relação sinal/ruído pode ser aplicada somente para processos analíticos que exibem linha de base. A determinação da razão sinal/ruído é realizada por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado. O limite de detecção pode ser considerado igual a razão sinal/ruído com valores de 2:1 ou 3:1 (KUSELMAN & SHENHAR, 1995, ICH 1996, EURACHEM 1998, SWARTZ & KRULL 1998, HUBER, 1998, BRITO et al, 2003).

Os valores encontrados da relação sinal ruído 2:1 para os piretróides estudados que estabelecem os limites de detecção do método estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 – Limite de detecção para os piretróides estudados

Piretróide	**Limite de detecção (mg/kg)**
Fenpropatrina	0,001
Lambda-cialotrina	0,001
Cipermetrina	0,001
Deltametrina	0,002
Fenvalerato	0,002
Trans-permetrina	0,002
Cis-permetrina	0,002
Bifentrina	0,002

4.5.4 Limite de Quantificação

O limite de quantificação é definido como o menor valor que pode ser quantificado, com confiabilidade de precisão e exatidão aceitáveis, para aquela condição analítica (LEITE, 1996). No presente trabalho o limite de quantificação foi estabelecido pela razão sinal/ruído 10:1, obtida por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco (KUSELMAN & SHENHAR, 1995, ICH 1996, EURACHEM 1998, SWARTZ & KRULL 1998, HUBER, 1998, BRITO et al, 2003). Os limites de quantificação do método estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 – Limite de quantificação para os piretróides estudados

Piretróide	**Limite de quantificação (mg/kg)**
Fenpropatrina	0,006
Lambda-cialotrina	0,008
Cipermetrina	0,004
Deltametrina	0,008
Fenvalerato	0,011
Trans-permetrina	0,008
Cis-permetrina	0,011
Bifentrina	0,011

De acordo com o procedimento estatístico utilizado para análise de resíduos de pesticidas, o limite de quantificação corresponde ao menor nível de fortificação estudado (DFG, 1997; AMARANTE et al, 2001).

4.5.5 Precisão

É a proximidade de concordância entre resultados de testes independentes obtidos sob condições estipuladas (AOAC/FAO/IAEA/IUPAC, 1999).

A precisão é determinada através dos estudos de recuperação efetuados em replicatas, ou seja, está relacionado com a repetitividade dos resultados da análise.

A precisão é dada pelo coeficiente de variação em relação à média das recuperações e ou pelo desvio padrão, quanto menor o coeficiente de variação das recuperações mais preciso será o método.

Para concentrações baixas, como em análise de resíduos de pesticidas, os valores de recuperação e coeficientes de variação são geralmente semelhantes os propostos pela comissão de especialistas das organizações AOAC, FAO, IAEA & IUPAC, 1999, mostrado na Tabela 22 (GREEN 1996, EPA 1996, BRITO et al 2003).

Tabela 20 – Intervalos de coeficiente de variação (CV%) e recuperações aceitos com relação a concentração do analito na amostra

Concentração	Repetitividade / Precisão	Exatidão
	Intervalo de CV aceito (%)	Intervalo de recuperação aceito (%)
≤ 1 μg/kg	35	50-120
> 1 μg/kg ≤ 0,01 mg/kg	30	60-120
> 0,01 mg/kg ≤ 0,1 mg/kg	20	70-120
> 0,1 mg/kg ≤ 1 mg/kg	15	60-110
> 1 mg/kg	10	60-110

Os CV% apresentados nas Tabelas 10 a 19 variaram entre 0,9 - 14,4 % e estão dentro do que é internacionalmente aceito para analise de resíduos de pesticidas, o que mostra que o método é preciso nas concentrações estudadas.

4.5.6 Exatidão

É a proximidade de concordância entre um valor médio obtido de um largo conjunto de resultados de testes a um valor de referência aceitável (AOAC/FAO/IAEA/IUPAC, 1999, GREEN 1996, EPA 1996, BRITO et al 2003).

A exatidão é estabelecida através das porcentagens de recuperação. Estes valores deverão estar entre 70 e 120% dentro do que está especificado na Tabela 22.

Todas as recuperações variaram entre 70 - 106%, resultados apresentados no Item 4.3.2, Recuperação, Tabelas 10 a 17, de acordo com os intervalos aceitos para as concentrações estudadas, o método proposto se mostra exato. Não foi possível a comparação com materiais certificados por não existir esta combinação (feijão/piretróide) específica no mercado.

4.5.7 Robustez

É a medida da capacidade dos resultados da análise permanecer inalterada por variações pequenas, mas deliberadas dos parâmetros do método que indicam a confiabilidade durante sua utilização normal (AOAC/FAO/IAEA/IUPAC, 1999).

Foi verificada através da realização das análises por diferentes analistas e diferentes datas. Ou seja, as 7 amostras fortificadas foram separadas em dois grupos de 3 e 4 amostras. Um dos grupos foi analisado em um dia por uma equipe de analistas (A) e o outro grupo em outro dia, 5 dias depois, por outra equipe de analistas (B) e a robustez pode ser observada verificando os valores de recuperação, Tabela 21, que se mantiveram sem grandes variações nos dois grupos de amostras analisadas separadamente.

Tabela 21 – Recuperação e desvio padrão encontrados pelas duas equipes, A e B, que analisaram as amostras fortificadas.

Produto e Nível de Fortificação (mg/kg)	Equipe de Analistas			
	A		B	
Fenpropatrina	Recuperação Média Obtida (mg/kg)	Desvio Padrão Relativo (%)	Recuperação Média Obtida (mg/kg)	Desvio Padrão Relativo (%)
0,010	108	17,0	101	8,8
0,100	80	2,3	80	3,9
1,000	91	14,3	92	12,7
Alfa-Cipermetrina				
0,010	93	7,4	105	1,6
0,100	78	2,4	79	1,4
1,000	99	2,3	99	1,8
Fenvalerato				
0,010	98	11,6	95	13,6
0,100	78	3,4	80	4,5
1,000	101	8,1	99	5,0
Bifentrina				
0,010	107	17,1	106	3,3
0,100	83	1,7	87	8,6
1,000	96	1,2	96	0,6
Lambda-Cialotrina				
0,010	102	12,3	106	13,8
0,100	72	1,2	69	2,2
1,000	95	3,6	94	1,3
Deltametrina				
0,010	87	6,8	104	10,2
0,100	72	1,5	72	3,7
1,000	95	4,6	91	1,2
Trans-Permetrina				
0,010	103	4,7	103	9,5
0,100	72	6,5	70	3,1
1,000	99	1,8	97	1,3
Cis-Permetrina				
0,010	94	5,9	99	6,3
0,100	84	0,7	85	3,9
1,000	99	1,5	99	2,2

4.6 Resultado das análises de amostras de feijão

Nenhuma das 48 amostras de feijão analisadas apresentou resíduos de pesticidas piretróides, este resultado é perfeitamente aceito visto a baixa persistência desses no meio ambiente e devido a alta atividade inseticida dos piretróides é possível a aplicação em pequenas dosagens.

Em um estudo realizado por LOPES & DÓRES (2003), na cidade de Aracaju Estado de Sergipe, foi encontrado 1,83 mg/kg de deltametrina em uma amostra de feijão, juntamente com o inseticida diazinon e propanil. Nenhuma outra referência da literatura nacional apresenta resíduo de piretróides em amostras de feijão. A presença destes inseticidas em amostras de feijão se dá pelo uso desses no processo de armazenamento dos grãos. Conforme discutido na introdução, a aplicação de pesticidas durante o armazenamento é recomendado como a técnica com melhor custo/benefício para controle de insetos. Os inseticidas mais recomendados para esta finalidade são os piretróides e organofosforados. Como nas amostras estudadas não se detectou a presença de piretróides, pode-se inferir a possibilidade de ocorrência de outros inseticidas, sendo que os organofosforados seriam uma primeira classe a ser estudada.

Os resultados obtidos na presente dissertação são coerentes com os estudos de NAKAMURA et al (1993), que obtiveram taxa de recuperação entre 60 e 103,5% em amostras fortificadas com concentrações entre 0,25 e 1,0 mg/kg. GALERA et al (2003) estudaram a dissipação de sete piretróides em condições de campo, definindo as equações matemáticas que melhor descreveram o decaimento das concentrações dos piretróides em função do tempo, bem como o tempo de meia vida. Os intervalos para colheita foram definidos a partir da curva de decaimento e do nível de concentração máximo permitido pela comunidade européia, verificando-se que a concentração residual de piretróides decai até mesmo mais rapidamente do que informado pelos fabricantes das formulações, indicando, portanto, o consumo seguro dos alimentos.

5. CONCLUSÃO

O método desenvolvido, utilizando a técnica de cromatografia líquido de alta eficiência com detecção por espectrofotometria de absorção molecular na região do ultra-violeta, que teve como base o método multi-resíduos DFG-S19, para a determinação de resíduos de 7 pesticidas da classe dos piretróides, mostrou-se eficiente para análise de feijão. Isto foi demonstrado nos resultados de validação, os quais estão de acordo com as diretrizes requisitadas, para validação de métodos analíticos, pelos principais órgãos nacionais e internacionais regulamentadores e normativos.

O diferencial deste método é o baixo limite de quantificação que se conseguiu em relação aos outros métodos descritos na literatura.

A ausência de resíduos de piretróides nas amostras analisadas sugere a boa qualidade do feijão consumido na cidade de São Paulo, o que atende à legislação brasileira neste setor, como ainda, indica que as normas de Boas Práticas Agrícolas estão sendo obedecidas e seguidas. Entretanto, para que esta conclusão seja confirmada, a presença de outras classes de inseticidas, especialmente os organofosforados, precisa ser investigada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE Jr. O. P.; CALDAS, E.P.A.; BRITO, N.M.; SANTOS, T.C.R. dos; VALE, M.L.B.F. Validação de métodos analíticos : uma breve revisão. **Caderno de Pesquisa**. 12, 116-131, 2001.

AOAC/FAO/IAEA/IUPAC – Expert Consultation. **Guidelines for Single-laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-level Conc. Of Organic Chemicals**. Miskolc. Hungary. 1999. 73p.

BENGSTON, M.; DAVIES, R.A.H.; DESMARCHELIER, J.M.; HENNING, R.; MURRAY, W.; SIMPSON, B.W.; SNELSON, J.T.; STICKA, R.; WALLBANK, B.E. Organophosphorothioates and synergised synthetic pyrethroids as grain protectants on bulk wheat. **Pesticide Science**. 14, 373-384, 1983.

BISSACOT, D.Z. & VASSILIEFF, I. HPLC determination of flumethrin, deltamethrin, cypermethrin and cyhalothrin residues in the milk and blood of lactating dairy cows. **Journal of Analytical Toxicology**. 21, 397-402, 1997.

BOTTOMLEY, P. & BAKER, P.G. Multi-residue determination of organoclorine, organophosphorus and synthetic pyrethroid pesticides in grain by gás-liquid ande high-performance liquid chromatography. Analyst. 109, 85-90, 1984.

Brasil. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografia de Produtos Agrotóxicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/monografias.pdf>. Acesso em 17 de março de 2004.

BRADBURY, S.P. & COATS, J.R. Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. **Environmental Contamination Toxicology**. 108, 133-77, 1989.

BRITO, N. M., AMARANTE; J. O. P. ,POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analítico: Estratégia e Discussão. **Pesticidas: Resíduos - Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. 13, 129-146, 2003.

CHEN, Z.M. & WANG, Y.H., Chromatografic methods for the determination of pyretrin and pirethroid pesticides residues in crops, foods and enviromental samples. **Journal Chromatography, A**. 754, 367-395, 1995.

CODEX ALIMENTARIUS. **Guide to Codex Maximum Residue Limits of Pesticides and Extraneous Maximum Residue Limits adopted by the Codex Alimentarius Commission 22nd Session**. Food and Agriculture of the United Nations. 1997.

CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticide Residues in Food – Methods of analysis and sampling**. Food and Agriculture of the United Nations. 2A, Part 1, 2000.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos.** 5 Ed, Campinas, Editora UNICAMP, 1993, p. 95-115 e p.143-81.

DARWISH, A. Determination of deltamethrin levels in wool by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography, A**. 17, 4215-4228, 1994.

DEBON, A. & SEGALEN, J.L. Trace analysis of pyretrins and piperonyl butoxide in water by high performance liquid chromatography. **Pyrethrum Post**. 17, 43-46, 1989.

DFG, Dt Forscherngsgemeinschaf, Pesticide Commission. **Manual of Pesticide Residue Analysis/DFG**. Ed. By Hans Peter Thier. v. 1. 1997. 432 p.

DFG, Dt Forscherngsgemeinschaf, Pesticide Commission. **Manual of Pesticide Residue Analysis/DFG**. Ed. By Hans Peter Their and Jochen Kirchhoff. v. 2. 1992. 481p.

Environmental Protection Agency. **Residue Chemistry Test Guidelines**. Office of Presention, Pesticides and Toxic Substances 860.1340: Residue Analytical Method, Washington:EPA, 1996 12p.

EURACHEM Working Group. **EURACHEM Guide - The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**..1998, 61p.

FERREIRA, C.R.R.P.T.& TSUNECHIRO, A . Evolução das vendas de defensivos agrícolas e uso de métodos alternativos e complementares de proteção de culturas no Brasil. **Biológico**. 60 (1), 35-49, 1998.

GALERA, M.M.; VIDAL, J.L.M.; FRENICH, A.G.; GARCIA, M.D.G. Determination of cypermethrin, fenvalerate, and cis- and trans-permetrin in soil and groundwater by high-performance liquid chromatography using partial least-squares regression. **Journal of Chromatography, A**. 727, 39-46, 1996.

GALERA, M.M.; GARCIA, M.D.G.; LALLENA, J.A.R; LOPEZ, T.L.; VIDAL, J.L.M. Dissipation of pyrethroids residues in pepper, zuchinis and green beans exposed to field treatments in greenhouses: Evaluation by decline curves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51, 5745-5751, 2003.

GEBARA, A.B. Eficácia de inseticidas piretróides no controle de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758). 1998. Tese (Doutorado em Saúde Publica) –Faculdade de Saúde Pública , Universidade de São Paulo, São Paulo.

GREEN, J.M. A Pratical Guide to Analytical Method Validation. **Analytical Chemistry News & Features**. 305A-309A, 1996.

HADDAD, P.R.; BRAYAN, J.G.; SHARP,G.J.; DILLI, S. Determination of pyrethroid residues on paddy rice by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography, A**. 461, 337-346,1989.

HEIGER, D. N. High Performance Capillary Electrophoresis. **Hewlett Packard Company, Publication**. n. 12 p. 5091-6199E. 1997.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC International**. 96-105, 1998.

ICH - Harmonised Trapartite Guideline. VALIDATION of analytcal procedures: methodology. CPMP/ICH/281/95. London ICH, 1996. 9p

JORGENSON, J. W. e LUKACS K. D. Zone Electrophoresis in Open-tubular Glass Cappilaries. **Analytical Chemistry**. 53. 1298, 1981.

KAZAKEIRCH Y. & McNAIR H. **Basic Liquid Chromatography.** 2000. Disponível em: < http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/>. Acesso em: 03 de novembro de 2005.

KUSELMAN, I., SHENHAR, A. Design of esperiment for the determination of the detection limit in chemical analysis. **Analytica Chimica Acta**. 306, 301-305. 1995.

LEITE, F. **Validação em análise química.** Campinas,SP: Editora Átomo, 1996. 124p.

LHOSTE, J. La lutte chimique contre les insectes nuisibles. **Les Presses Faculte Médecine Pharmacie de Marseille**. 1966. 65p.

LOPES, W.G., DÓRES, H. G., Determinação de pesticidas em feijão por dispersão da matriz em fase sólida (DMFS). **Pesticidas: Resíduos Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. 13, 13-73, 2003.

MAGALHÃES H. Feijoeiro comum tem boa receptividade no mercado nacional. **Banco de Notícias, EMBRAPA – Arroz e feijão**. Santo Antonio de Goiás/GO. Disponível em: <http://www21.sede.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2005/janeiro/noticia.2005-01-19.6737902350/mostra_noticia>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2006.

McMASTER, MARVIN, C. **HPLC a Pratical User's Guide.** John Willey & Sons. Inc.. 1994. 211p.

MUSZAT, L.; AHARONSON, N.; ZWEIG, G.; SHERMA, J. **Modern Analytical Techniques.** v. 14, p.95-131. 1986.

NAKAMURA, Y.; TONOGAI, Y.;TSUMURA, Y.; ITO, Y. Determination of pyrethroid residues in vegetables, fruits, grains, beans, and green tea leaves – Applications to pyrethroid residues monitoring studies. **Journal of AOAC International**. 76, 1348-1361,1993.

NAKAMURA, y.; TONOGAI, Y.; SEKIGUCHI, Y.; TSUMURA, Y.; NISHIDA,N.; TAKAKURA, K.; ISECHI, M.; YUASA, K.; NAKAMURA, M.; KIFUNE, N.; YAMAMOTO, K.; TERASAWA, S.; OSHIMA, T.; MIYATA, M.; KAMAKURA, K. Multiresideu Analysis of 48 Pesticides in Agricultural Products by Capillary Gás Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 42, 2508-2518. 1994.

SEBRAE. **Cultivo de Feijão**. Disponível em: < http://www.sebraemg.com.br/Geral/arquivo_get.aspx?cod_areasuperior=2&cod_areaconteudo=231&cod_pasta=234&cod_conteudo=1509&cod_documento=111>. Acesso em: 18 de maço 2006.

SPECHT, W.; PELZ, S.; GILSBACH, W. Gas-chromatographic determination of pesiticide residues after clean-up by gel-permeation chromatography and mini-silica-gel chromatography. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**. 353, 183-190. 1995.

SWARTZ, M. E. & KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**. p. 12-20. 1998.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar. **Química Nova**. 20, 493-511, 1997.

TESSIER, J. Hacia el deltametrin. In ROSSEL-UCLAF: Deltametrin. Paris, **Roussel-Uclaf**. 25-36. 1983.

TISELIUS, A. The Moving-Boundary Method of Studying the Electrophoresis of Proteins. **Tese de Doutorado, University of Uppsala, Suécia**, 1930.

WANDER, A. E. Cultivo do feijão irrigado na região noroeste de Minas Gerais. **Embrapa Arroz e Feijão – Sistemas de Produção**. n. 5. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrrigadoNoroesteMG/index.htm>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2006.

ZANELLA, R.; MARTINS, A.F.; PAVAN, F. A.; DALLAGO, R.M. Determinação da distribuição da deltametrina nas caldas de banhos de imersão para bovinos. **Pesticidas: Resíduos Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. 8, 27-32. 1998.

ZUPPI, M.; MENTEM, J. O. M.; FERREIRA-LIMA; RABALHO, A. A.; FRARE, V. C. **Pesticidas utilizados no feijoeiro no Brasil : Evolução e situação atual.** Disponível em: < http://www.cnpaf.embrapa.br/conafe/pdf/palestra17.pdf>. Acessado em 11 de abril de 2006.