

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO POR
SDME/GC-MS PARA A DETERMINAÇÃO DE 19 PESTICIDAS EM
AMOSTRAS DE ÁGUA DE COCO E VINHO BRANCO**

JEANCARLO PEREIRA DOS ANJOS

SALVADOR - BA

2014

JEANCARLO PEREIRA DOS ANJOS

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO POR
SDME/GC-MS PARA A DETERMINAÇÃO DE 19 PESTICIDAS EM
AMOSTRAS DE ÁGUA DE COCO E VINHO BRANCO**

Tese apresentada à Universidade Federal da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Química, área de concentração em Química Analítica, para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador

Prof. Dr. Jailson Bittencourt de Andrade

**SALVADOR
BAHIA – BRASIL
2014**

Sistema de Bibliotecas/IQ - UFBA

Anjos, Jeancarlo Pereira dos.
Desenvolvimento e aplicação de método multirresíduo por SDME/GC-MS para a determinação de 19 pesticidas em amostras de água de coco e vinho branco / Jeancarlo Pereira dos Anjos. - 2014.
82 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Jailson Bittencourt de Andrade.
Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2014.

1. Pesticidas. 2. Água de coco. 3. Vinho e vinificação – Análise. 4. Vinho branco.
I. Andrade, Jailson Bittencourt de. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. III. Título.

CDD – 631.80981
CDU – 504.05:632.95


TERMO DE APROVAÇÃO

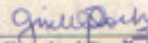
JEANCARLO PEREIRA DOS ANJOS


Desenvolvimento e aplicação de método multirresíduo por SDME/GC-MS para a determinação de 19 pesticidas em amostras de água de coco e vinho branco.


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

Prof. Dr. Jailson Bittencourt de Andrade 
Doutorado em Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Wilson Araújo Lopes 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Gisele Olímpio da Rocha 
Doutorado em Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Maria das Graças Cardoso 
Doutorado em Química pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
Universidade Federal de Lavras

Prof. Dr. Marta Valéria Almeida Santana 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade do Estado da Bahia

Salvador, 05 de fevereiro de 2014.

*À minha família pelo incentivo, apoio e
compreensão, na certeza de que esta vitória
seria alcançada.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em todos os momentos de minha vida e me acompanhar em cada passo de mais uma vitória. Por proporcionar-me a oportunidade de tamanho crescimento pessoal durante esses anos.

A meus familiares, pela compreensão nos meus momentos de ausência, apoio e incentivo em todas as etapas desse trajeto. Pelos conselhos e força diante das dificuldades.

À minha família baiana, que me recebeu tão bem durante todos esses anos e pela excelente amizade: Aline Lefol, Lílian Lefol, Bárbara, Marina, Sandra e Monique. Em especial, a Aline Lefol por incentivar e apoiar minha vinda para a Bahia, a Monique pela amizade e companheirismo dentro e fora do IQ/UFBA e a Lílian Lefol pelo companheirismo, amizade, preocupação e dedicação em estar sempre ao meu lado nos momentos de alegrias e dificuldades.

Ao Prof. Jailson B. de Andrade pela confiança, ensinamentos, amizade e por todas as oportunidades concedidas nesses anos de convivência.

À Profa. Gisele Olímpio da Rocha (IQ/UFBA), pelos ensinamentos e apoio durante a construção deste conhecimento.

Ao Prof. Wilson Lopes (IQ/UFBA), pela amizade, ensinamentos e contribuições.

À Profa. Maria das Graças Cardoso (UFLA), que me apoiou no início de todo meu trajeto acadêmico e tanto me incentivou a buscar novos conhecimentos.

À Profa. Marta Valéria (UNEB), pelas contribuições para a melhoria do nosso trabalho com sua participação na banca avaliadora.

À Universidade Federal da Bahia e ao Instituto de Química, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho e pelo saudoso acolhimento.

A todos os amigos do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Química: Sandro, Manuela, Eliane, Luciane, Rogério, Ana Célia, Elayne, Neto, Ana Carla, Aldo, Luciano, Nina, Juliana, Mateus, Paula, João Vítor, Hortência, Geórgia, Fábio, Paulo, Cristiane, Lucas, Rafael Yoshimura, Rafael Dourado, Samantha, Caio, Rogete, Joelma, Clícia, Marcela e Stelyus, pela boa convivência, amizade e contribuições.

Ao Sr. Dorisvaldo, pelo apoio técnico e aprendizados na manutenção dos equipamentos.

A todos os professores e funcionários do IQ/UFBA pelos ensinamentos e assistência. Aos professores Pedro Afonso, Luiz Carvalho, Luciana, Cláudia, Vanessa e Daniel Grosjean pela boa convivência e ensinamentos ao longo desta caminhada.

Ao CNPq, CAPES, FINEP, CIEnAm, INCT de Energia e Ambiente, FAPESB, Petrobras e FAPEX pelo suporte financeiro. E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e para o alcance deste sonho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Pesticidas.....	4
2.2 Microextração com gota única (SDME).....	12
2.3 Bebidas.....	21
2.3.1 Água de coco.....	21
2.3.2 Vinho.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Preparação dos padrões e reagentes.....	34
3.2 Obtenção e preparação das amostras.....	34
3.2.1 Amostras de água de coco.....	34
3.2.2 Amostras de vinho branco.....	35
3.3 Microextração com gota única (SDME).....	35
3.4 Análises cromatográficas.....	36
3.4.1 Figuras de mérito.....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1 Otimização das condições experimentais para SDME.....	44
4.1.1 Influência da graduação alcoólica do vinho na extração dos pesticidas por SDME.....	50
4.2 Validação do método analítico.....	52
4.3 Aplicação do método analítico em amostras reais	61
4.3.1 Água de coco.....	61
4.3.2 Vinho branco.....	65
5 CONCLUSÕES.....	70
6 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	71
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
ANEXO.....	82

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Destino dos pesticidas no meio ambiente.....	6
Figura 2	Estruturas químicas dos pesticidas selecionados neste estudo.....	9
Figura 3	Classificação da microextração com gota única (SDME).....	15
Figura 4	Esquema de um sistema para SDME com imersão direta.....	16
Figura 5	Esquema de um sistema para SDME no modo <i>headspace</i>	20
Figura 6	Área plantada e produção de coco no Brasil.....	24
Figura 7	Esquema das etapas que envolvem a produção de vinho branco e vinho tinto	27
Figura 8	Regiões vinícolas do Brasil.....	28
Figura 9	Esquema das etapas utilizadas no procedimento para SDME.....	36
Figura 10	Cromatograma obtido por GC-MS (modo TIC) da solução padrão de pesticidas (10 µg L ⁻¹) após otimização dos parâmetros de extração por SDME. Identificação dos picos: 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 – dimethoate; 5 - demeton-O; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 – azoxystrobin.....	39
Figura 11	Áreas obtidas para a otimização do solvente (tempo de extração: 30 min.; volume da gota: 1,0 µL). Solução padrão (50 µg L ⁻¹): 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 – demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 – azoxystrobin.....	44
Figura 12	Áreas obtidas para a otimização do tempo de extração (solvente: tolueno; volume da gota: 1,0 µL). Solução padrão (50 µg L ⁻¹): 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 – demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 – azoxystrobin.....	45
Figura 13	Áreas obtidas para a otimização do volume da gota (solvente: tolueno; tempo de extração: 30 min.). Solução padrão (50 µg L ⁻¹): 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 – demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 -	

	fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 – azoxystrobin.....	46
Figura 14	Áreas obtidas para a otimização do volume de solução. Solução padrão (25 $\mu\text{g L}^{-1}$): 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 – demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 – azoxystrobin.....	47
Figura 15	Áreas obtidas para a otimização da velocidade de agitação. Solução padrão (25 $\mu\text{g L}^{-1}$): 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 – demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 – azoxystrobin.....	48
Figura 16	Correlação entre as respostas obtidas para a extração dos pesticidas sem utilização de ácido e acidificando o meio com ácido fosfórico e ácido clorídrico, respectivamente. Solução padrão (25 $\mu\text{g L}^{-1}$): 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 – demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 – azoxystrobin.....	49
Figura 17	Efeito <i>salting-out</i> na eficiência de extração de pesticidas por SDME. Solução padrão (25 $\mu\text{g L}^{-1}$): 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 – demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 – azoxystrobin.....	50
Figura 18	Influência da graduação alcoólica na extração dos pesticidas, usando SDME, em solução padrão (10 $\mu\text{g L}^{-1}$). Pesticidas: 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 – demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 – azoxystrobin.....	51
Figura 19	Correlação entre as respostas obtidas para a eficiência de extração dos pesticidas em solução padrão aquosa (etanol 0%) e em solução padrão	

	alcoólica (etanol 15%). Pesticidas: 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 - demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 - azoxystrobin.....	52
Figura 20	Cromatogramas obtidos por GC-MS (modo TIC) de uma das amostras de água de coco (A) e da mesma amostra adicionando-se os padrões de pesticidas numa concentração de 10 µg L ⁻¹ (B), para a certificação da seletividade. Identificação dos picos: 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 - demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 - azoxystrobin.....	53
Figura 21	Cromatogramas obtidos por GC-MS (modo TIC) de uma das amostras de vinho branco (A) e da mesma amostra adicionando-se os padrões de pesticidas numa concentração de 10 µg L ⁻¹ (B), para a certificação da seletividade. Identificação dos picos: 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 - demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 - azoxystrobin.....	54
Figura 22	Cromatograma obtido por GC-MS (modo TIC) de uma das amostras de água de coco industrializada. Identificação dos picos: 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 - dimethoate; 5 - demeton-O; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 - azoxystrobin.....	61
Figura 23	Gráfico de PCA loadings para as concentrações de pesticidas em amostras de água de coco industrial e artesanal; I = amostras de água de coco industrial e N = amostras de água de coco natural.....	64
Figura 24	Dendograma para as amostras de água de coco industrial e artesanal em relação às concentrações de pesticidas; I = amostras de água de coco industrial e N = amostras de água de coco natural.....	65
Figura 25	Cromatogramas obtidos por GC-MS (modo TIC) de duas amostras de vinho branco. Identificação dos picos: 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4	

- dimethoate; 5 - demeton-O; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 – azoxystrobin..... 66

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1	Área plantada das principais culturas brasileiras..... 4
Tabela 2	Classificação dos pesticidas segundo seus alvos..... 5
Tabela 3	Propriedades físico-químicas dos pesticidas selecionados neste estudo..... 12
Tabela 4	Informações sobre as amostras de vinho branco analisadas..... 35
Tabela 5	Parâmetros experimentais selecionados para análise dos pesticidas por GC-MS..... 38
Tabela 6	Parâmetros das curvas analíticas e os respectivos coeficientes de determinação (R^2)..... 55
Tabela 7	Médias das áreas dos picos ($n = 5$) e coeficientes de variação (CV) obtidos para cada pesticida na avaliação da precisão do método..... 56
Tabela 8	Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os pesticidas analisados..... 57
Tabela 9	Recuperação dos pesticidas em amostra de água de coco..... 58
Tabela 10	Recuperação dos pesticidas em amostra de vinho branco..... 60
Tabela 11	Concentração dos pesticidas ($\mu\text{g L}^{-1}$) encontrados nas amostras de água de coco..... 62
Tabela 12	Concentração dos pesticidas ($\mu\text{g L}^{-1}$) encontrados nas amostras de vinho branco ^a 67
Tabela 13	Quantidade de pesticida ingerida (μg) por taça de vinho (150 mL) consumida..... 69

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Atomic Absorption Spectroscopy Espectroscopia de Absorção Atômica
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos
CE	Capillary electrophoresis Eletroforese Capilar
CF	Continuous Flow Fluxo Contínuo
CUPs	Currently Used Pesticides Pesticidas de Uso Corrente
CV	Coefficiente de Variação
DD	Drop-to-Drop Gota a Gota
DDE	Dichlorodiphenyldichloroethylene Diclorodifenildicloroetileno
DI	Direct Immersion Imersão Direta
DI-SDME	Direct Immersion Single-Drop Microextraction Microextração com Gota Única com Imersão Direta
DLLME	Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Microextração Líquido-Líquido Dispersiva
DSD	Directly Suspended Droplet Gota Diretamente Suspensa
ECD	Electron Capture Detector Detector por Captura de Elétrons
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ET-AAS	Electrothermal Atomic Absorption Spectroscopy Espectroscopia de Absorção Atômica Eletrotérmica
GC-FID	Gas Chromatography with Flame Ionization Detector Cromatografia a Gás com Detector de Ionização de Chama
GC-ITMS	Gas Chromatography acoupled to Ion Trap Mass Spectrometry Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas <i>Ion Trap</i>

GC-MS	Gas Chromatography acoupled to Mass Spectrometry Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massa
GC-MS/MS	Gas Chromatography acoupled to Mass Spectrometry tandem Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas <i>tandem</i>
HCA	Hierarchical Cluster Analysis Análise Hierárquica de <i>Cluster</i>
HF(2)ME	Hollow-Fiber-Protected 2-Phase Microextraction Microextração por fibra oca de 2 fases
HF(3)ME	Hollow-Fiber-Protected 3-Phase Microextraction Microextração por fibra oca de 3 fases
HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos
HPLC-FLD	High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência
HPLC-UV	High Performance Liquid Chromatography with Ultra Violet Detector Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Ultravioleta
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography Cromatografia de Alta Eficiência em Camada Fina
HS-SDME	Headspace Single-Drop Microextraction Microextração com Gota Única por <i>Headspace</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Plasma Indutivamente Acoplado a Espectrometria de Massas
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LC-ESI-MS/MS	Liquid Chromatography with Electrospray Ionization acoupled to Mass Spectrometry tandem Cromatografia Líquida com Ionização <i>Eletrospray</i> acoplada a Espectrometria de Massas <i>tandem</i>
LC-MS	Liquid Chromatography acoupled to Mass Spectrometry Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas
LC-TOF-MS	Liquid Chromatography acoupled to Time of Flight Mass Spectrometry Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas por Tempo de Voo

LD	Limite de Detecção
LLE	Liquid Liquid Extraction Extração Líquido-líquido
LLLME	Liquid-Liquid-Liquid Microextraction Microextração Líquido-líquido-líquido
LLL-SDME	Liquid-Liquid-Liquid Single-Drop Microextraction Microextração com Gota Única Líquido-Líquido-Líquido
LLME	Liquid-Liquid Microextraction Microextração Líquido-líquido-líquido
LPME	Liquid Phase Microextraction Microextração em Fase Sólida
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEKC	Micellar Electrokinetic Chromatography Cromatografia Eletrocínética Micelar
MSPD	Matrix Solid Phase Dispersion Dispersão da Matriz em Fase Sólida
PCA	Principal Component Analysis Análise dos Componentes Principais
POP	Persistent Organic Poluents Poluentes Orgânicos Persistentes
RSD	Relative Standard Deviation Desvio Padrão Relativo
SDME	Single-Drop Microextraction Microextração com Gota Única
SIM	Selected Ion Monitoring Monitoramento do Íon Seletivo
SME	Solvent Microextraction Microextração com Solvente
SPE	Solid Phase Extraction Extração em Fase Sólida
SPME	Solid Phase Microextraction Microextração em Fase Sólida
SPME-HS	Solid Phase Microextraction Headspace Microextração em Fase Sólida por <i>Headspace</i>

TIC	Total Ions Chromatogram Cromatograma de Íons Totais
UV-vis	Ultra Violet - visible Ultravioleta-visível

RESUMO

Tem sido observado um aumento significativo na produção e utilização de pesticidas nas mais diferentes lavouras para combater a ação de inúmeras pragas, a fim de garantir um bom rendimento na produção de alimentos. Estas substâncias são persistentes no meio ambiente, promovendo grande preocupação quanto a sua presença nos alimentos, o que pode representar um problema de saúde pública. O grande desafio da análise de pesticidas em alimentos é devido às suas baixas concentrações. Isso revela a necessidade de se desenvolver métodos analíticos sensíveis capazes de quantificar estas espécies. A microextração com gota única (SDME) foi desenvolvida recentemente como uma técnica de preparo de amostras para a análise de pesticidas tendo como vantagens sua simplicidade, baixo custo e por ser possível a extração e pré-concentração dos analitos em uma única etapa. Dentre as matrizes mais complexas, destaca-se a água de coco que vem sendo alvo de estudos recentes na determinação de pesticidas, já que estes compostos podem estar presentes na bebida *in natura* ou processada. Por outro lado, os vinhos são estudados pelo fato de que as substâncias aplicadas nas uvas podem passar para o mosto, durante o processo de produção e, conseqüentemente para o produto final. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver um método analítico para a determinação simultânea de 19 pesticidas usando a microextração com gota única (SDME) e subsequente análise por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Posteriormente, aplicar o método desenvolvido em amostras reais de água de coco (industrializada e natural) e vinho branco. O método de extração foi otimizado e validado com sucesso para a análise de pesticidas em níveis traço em diferentes bebidas, com limites de detecção na faixa de 0,1 a 0,88 $\mu\text{g L}^{-1}$ e limites de quantificação de 1,21 a 6,69 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em amostra reais de água de coco constatou-se a presença dos pesticidas sulfotep, demeton-O, dimethoate, disulfoton, fenitrothion e malathion em concentrações que variaram de <LQ a 12,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (dimethoate), com as maiores concentrações de pesticidas encontradas para as amostras de água de coco industrializadas. Oito pesticidas (carbofuran, molinate, dimethoate, demeton-O, fenitrothion, malathion, dursban e azoxystrobin) foram identificados e quantificados em amostras reais de vinho branco, com concentrações abaixo de 31,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, destacando-se a presença de carbofuran na maioria das amostras de vinho analisadas. O método proposto apresentou alta sensibilidade e capacidade de detectar e quantificar baixas concentrações de pesticidas em água de coco e vinho branco.

Palavras-chave: Pesticidas, Água de coco, Vinho branco, SDME, GC-MS

ABSTRACT

A significant increase in the production and use of pesticides has been observed in many different fields to fight the action of numerous pests, in order to ensure a good yield in food production. These substances are persistent in the environment, being a major concern regarding their presence in foods, which may represent a public health problem. The big challenge of the pesticide analysis in foods is due to their low concentrations. It shows the need to develop sensitive analytical methods, capable of quantifying these substances. Single-drop microextraction (SDME) was recently developed as a technique of sample preparation for pesticide analysis, with the following advantages: simplicity, low cost, and the extraction, as well as preconcentration of analytes, is possible in a single step. Among the most complex matrices, coconut water stands out, and has been the subject of recent studies on the determination of pesticides, since these compounds may be present in the fresh or processed drink. On the other hand, wines are studied by the fact that the substances applied to grapes can pass into the must during the manufacturing process and, therefore, into the final product. Therefore, this study aimed to develop an analytical method for the simultaneous determination of 19 pesticide residues using single-drop microextraction (SDME) and subsequent analysis by gas chromatography, coupled to mass spectrometry (GC-MS). Subsequently, apply the developed method to real samples of coconut water (industrialized and natural) and white wine. The extraction method was optimized and successfully validated for the analysis of pesticides at trace levels in different drinks, with detection limits ranging from 0.1 to 0.88 $\mu\text{g L}^{-1}$ and quantification limits from 1.21 to 6.69 $\mu\text{g L}^{-1}$. In real samples of coconut water, the pesticides sulfotep, demeton-O, dimethoate, disulfoton, fenitrothion and malathion were found at concentrations ranging from <LQ to 12.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (dimethoate), with the highest pesticide concentrations found for the industrialized samples of coconut water. Eight pesticides (carbofuran, molinate, dimethoate, demeton-O, fenitrothion, malathion, dursban and azoxystrobin) were identified and quantified in real samples of white wine, with concentrations below 31.7 $\mu\text{g L}^{-1}$, highlighting the presence of carbofuran in most of the wine samples analyzed. The proposed method showed a high sensitivity and ability to detect and quantify low levels of pesticides in coconut water and white wine.

Keywords: Pesticides, Coconut water, White wine, SDME, GC-MS

1 INTRODUÇÃO

Diante do aumento da demanda por alimentos promovida pelo crescimento da população mundial, têm se observado um incremento significativo na produção e utilização de pesticidas nas mais diferentes lavouras. Diversos compostos sintéticos (com diferentes denominações tais como agrotóxico, pesticida ou defensivo agrícola) têm sido usados para combater a ação de inúmeras pragas às lavouras, a fim de garantir um bom rendimento na produção de alimentos.

Muitas destas substâncias apresentam conhecidos malefícios à saúde humana devido à sua potencialidade carcinogênica, teratogênica e cumulativa. Os danos que estes compostos podem causar à saúde vão além do momento de sua aplicação, podendo ser prejudiciais até mesmo tempos após terem sido aplicados, já que são substâncias persistentes no meio ambiente, promovendo grande preocupação quanto a sua presença nos alimentos consumidos *in natura* resultando em um problema de saúde pública.

Outra preocupação diz respeito à presença dos pesticidas em alimentos processados, uma vez que muitas destas substâncias são persistentes às diferentes etapas de produção de inúmeros alimentos, estando presentes como contaminantes no produto final.

O grande desafio da análise de pesticidas em diversos tipos de matrizes, sejam elas ambientais ou alimentos, é devido às suas baixas concentrações. Isso mostra a necessidade de se desenvolver métodos analíticos sensíveis capazes de detectar e quantificar estas substâncias nas mais diferentes matrizes. Paralelo a isto, deve-se levar em consideração a complexidade da matriz devido ao fato de que muitos compostos presentes nesta podem comprometer a detecção dos pesticidas em baixas concentrações. Para que isto seja possível, muitas vezes é necessária a execução de várias etapas de preparação de amostras englobando extração, *clean-up* e concentração executadas de forma independente, tornando o processo bastante dispendioso.

Diferentes métodos de preparação de amostras tem surgido com o objetivo de analisar pesticidas em diversas matrizes. Neste sentido, técnicas como a extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME) (bem como suas variações e aperfeiçoamentos) tem apresentado ampla aplicação para a determinação de pesticidas. Contudo, muitas vezes é necessário executar mais de uma etapa de preparação das amostras para a análise dos pesticidas em níveis de traço, o que pode tornar a análise demorada e com um custo elevado, além de promover a execução de muitos erros analíticos que podem prejudicar na repetibilidade do método desenvolvido.

Todavia, a microextração com gota única (SDME) foi desenvolvida recentemente como uma técnica de preparo de amostras para a análise de pesticidas e tem apresentado algumas

vantagens com relação às técnicas mencionadas anteriormente tais como menor tempo para execução, baixo custo, baixo consumo de solventes orgânicos (estando de acordo com os princípios da Química Verde), uso de materiais simples e por ser possível extrair e pré-concentrar os analitos de maneira eficiente em uma única etapa.

Esta técnica se baseia no princípio de distribuição dos analitos entre a fase aquosa (amostra) e uma microgota de solvente orgânico exposta na ponta de uma agulha de uma microseringa. Após a etapa de SDME, os analitos são identificados e quantificados em diferentes instrumentos analíticos, com destaque para a cromatografia a gás e a cromatografia líquida com seus diferentes modos de detecção. Atualmente, a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) tem sido uma ferramenta bastante utilizada para a análise de pesticidas devido à sua sensibilidade, seletividade e versatilidade na análise de compostos de diferentes classes químicas. Assim, tem sido possível realizar a análise de pesticidas nos mais diferentes tipos de matrizes, principalmente em alimentos.

A água de coco é uma das matrizes que vêm sendo alvo de estudos recentes na determinação de pesticidas, apesar de ainda ser observada uma carência no desenvolvimento de métodos sensíveis para a análise destas substâncias na bebida. Os pesticidas podem contaminar a água de coco por meio de sua aplicação, seja ela por pulverização sobre a copa das árvores ou pela injeção dos princípios ativos nos caules dos coqueiros, podendo estar presentes na bebida *in natura* ou processada.

Outra matriz cuja presença de pesticidas vem causando preocupação entre os pesquisadores é o vinho, uma vez que as substâncias aplicadas nas uvas utilizadas para a produção da bebida podem passar para o mosto, durante o processo de produção e, conseqüentemente para o produto final, em concentrações significativamente baixas.

Diante da preocupação com relação à aplicação de vários aditivos químicos para o controle de pragas em diferentes lavouras e a possibilidade de contaminação das respectivas matrizes citadas anteriormente, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e eficientes para a detecção de baixas concentrações dessas substâncias uma vez que são conhecidos inúmeros malefícios que a ingestão desses compostos pode trazer para a saúde humana.

1.1 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um método analítico para a determinação simultânea de 19 pesticidas de diferentes classes químicas (organofosforado, organoclorado, piretróide, carbamato, tiocarbamato e estrobilurina) usando a microextração com gota única

(SDME) como etapa de preparação de amostras e subsequente análise por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Posteriormente, aplicar o método desenvolvido em amostras reais de água de coco (industrializada e natural) e vinho branco.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Pesticidas

A população mundial tem apresentado um crescimento significativo nas últimas décadas, tornando-se necessário um aumento na produção de alimentos. Porém, as restrições para a expansão agrícola territorial no Brasil fazem com que este aumento ocorra por meio do crescimento da produtividade, ou seja, produzir mais no menor espaço possível, sendo que a produção agrícola brasileira está concentrada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Considerando estas regiões, a expansão parece ser problemática em decorrência da falta de área potencialmente agriculturável, restando apenas o Nordeste e a Amazônia para um possível aumento considerável da área cultivada (Zarbin et al., 2009).

De acordo com dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), o Brasil possui uma área total de 851 milhões de hectares e, em outubro de 2013, estima-se que a área utilizada para a produção agrícola foi em torno de 67 milhões de hectares, estando as principais culturas apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1 – Área plantada das principais culturas brasileiras

Cultura	Área plantada (ha)
Soja	27.731.072
Milho	15.311.002
Cana-de-açúcar	9.497.840
Feijão	2.854.673
Arroz	2.355.299
Trigo	2.185.666
Café	2.023.526
Mandioca	1.480.350

Fonte: IBGE (2013).

Diante do crescimento demográfico e o aumento na demanda por alimentos, houve a necessidade de se utilizar pesticidas nas lavouras para garantir alimentos suficientes à população (Cabrera et al., 2008). O desenvolvimento da Síntese Orgânica, durante a Segunda Guerra Mundial, e a consolidação do padrão tecnológico da agricultura moderna tiveram importância fundamental no desenvolvimento da indústria mundial de agrotóxicos (Spadotto, 2006). O

grande emprego de pesticidas orgânicos desde 1940 promoveu um aumento na produtividade possibilitando o atendimento da demanda alimentícia em diversos países (Rissato et al., 2004). Diferentes denominações como agrotóxico, defensivo agrícola, praguicida, pesticida e biocida são usadas de maneira geral para indicar os produtos químicos sintetizados artificialmente para conter a ação de pragas invasoras (animais, vegetais, insetos, dentre outros) que interferem na qualidade ou quantidade de lavouras, alimentos, rações, flores, forragens e fibras (Moragas & Schneider, 2003).

A utilização de agrotóxicos nas produções agrícolas vem ganhando cada vez mais destaque no cenário mundial. O Brasil é um dos maiores consumidores desses produtos químicos devido ao modelo agrícola adotado e à ampla diversidade biológica, a qual favorece a incidência de pragas e moléstias (Moragas & Schneider, 2003; Silva et al., 2011).

De acordo com os organismos-alvos que se deseja atingir, os pesticidas podem ser agrupados em diferentes classes, conforme apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2 – Classificação dos pesticidas segundo seus alvos.

Tipo de pesticida	Organismo-alvo
acaricida	ácaros
algicida	algas
avicida	pássaros
bactericida	bactérias
fungicida	fungos
herbicida	plantas
inseticida	insetos
larvicida	larvas de insetos
moluscicida	caracóis, lesmas
nematicida	nematóides
piscicida	peixes
raticida	roedores

Fonte: Baird, 2002.

Estima-se que sejam utilizados, aproximadamente, 11,2 milhões de toneladas de pesticidas anualmente em todo o mundo, destacando-se a quantidade de substâncias químicas tóxicas que são lançadas no meio ambiente (Shunthirasingham et al., 2010).

A aplicação de pesticidas pode ocorrer por via sólida, líquida ou gasosa, sendo que a forma líquida é a maneira predominantemente utilizada, onde uma formulação é geralmente

diluída em água formando a calda, a qual é aplicada na forma de gotas por meio de pulverização. Após a aplicação, vários processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos determinam o comportamento dos pesticidas no ambiente. O destino destes compostos no ambiente é governado por processos de retenção (adsorção e absorção), transformação (degradação química e biológica) e de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial), além de interações destes processos (Figura 1) (Spadotto, 2006).

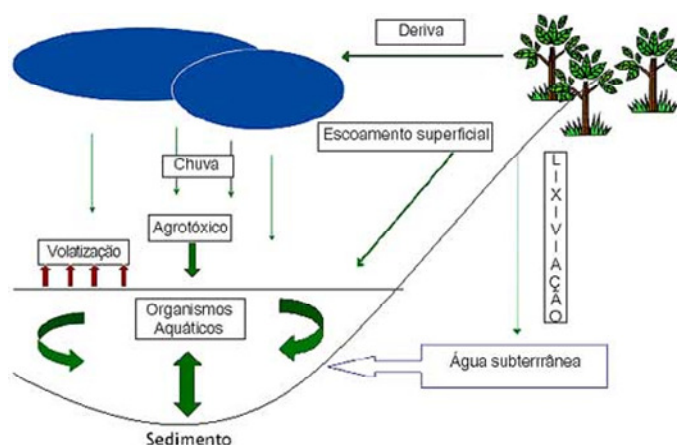


FIGURA 1 – Destino dos pesticidas no meio ambiente. Fonte: Tomita & Beyruth, 2002.

A utilização de diferentes princípios ativos de agrotóxicos para o controle de pragas certamente contribui para a redução de doenças no sistema produtivo agropecuário, proporcionando um aumento na produção agrícola. Contudo, resíduos desses compostos podem permanecer no ambiente por longos períodos e causar impactos nocivos a diferentes ecossistemas (Silva et al., 2011). Algumas das consequências indesejáveis do uso de pesticidas incluem a presença de resíduos no solo, água e ar; resíduos em plantas e tecidos animais; a destruição de microrganismos do solo; efeitos prejudiciais em organismos não-alvo; mortalidade de insetos benéficos; e a presença de resíduos em alimentos (Pinheiro & De Andrade, 2009).

A presença de resíduos de pesticidas em alimentos, ar e água tem sido identificada como uma provável causa para o aumento da incidência de câncer e outras doenças que afetam a saúde humana (devido às suas propriedades mutagênicas, teratogênicas e a capacidade de imitar a ação de hormônios), tornando o monitoramento desses compostos, em diferentes matrizes, de extrema importância para que problemas de saúde pública sejam minimizados e/ou evitados (Pinheiro & De Andrade, 2009; Dors et al., 2011; Silva et al., 2011).

Menezes Filho et al. (2010) propuseram um método para a determinação simultânea de 16 pesticidas (trichlorfon, diazinon, methyl parathion, malathion, fenthion, ethion, bifenthrin,

permethrin, cypermethrin, imazalil and prochloraz, azoxystrobin, pyraclostrobin, carbofuran, clofentezine e difenoconazole) (7 classes químicas diferentes) em água, utilizando a técnica de microextração em fase sólida (SPME) seguida pela cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Estes autores verificaram a presença de methyl parathion em 5, das 26 amostras estudadas, com uma concentração média de $0,17 \text{ ng mL}^{-1}$. Também foram constatados resíduos de bifenthrin, pyraclostrobin e azoxystrobin em 3 amostras, com concentrações de 2,28; 3,12 e $0,15 \text{ ng mL}^{-1}$, respectivamente. Vale ressaltar que os níveis de contaminação de methyl parathion em água subterrânea foram bastante significativos, em comparação com os limites máximos estabelecidos pelo Ministério da Saúde, no Brasil, ($0,04 \text{ ng mL}^{-1}$), uma vez que a população que vive próxima à área de coleta das amostras utiliza esta água para consumo pessoal.

Trabalhos de Menezes Filho et al. (2011), avaliando a presença de 14 resíduos de pesticidas (clofentezine, carbofuran, diazinon, methyl parathion, malathion, fenthion, thiabendazole, imazalil, bifenthrin, permethrin, prochloraz, pyraclostrobin, difenoconazole e azoxystrobin) em manga, mostraram que todas as amostras analisadas apresentaram resíduos de bifenthrin e azoxystrobin com concentrações na faixa de $18,3\text{-}57,4 \text{ mg kg}^{-1}$ e $12,7\text{-}55,8 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente, apesar das concentrações de todos os pesticidas estudados estarem abaixo dos limites máximos aceitos pela legislação brasileira.

Dors et al. (2011) avaliaram a distribuição dos agrotóxicos bispyribac-sodium, carbofuran, clomazone e tebuconazole em diferentes frações de arroz beneficiado (arroz branco, farelo de arroz, arroz com casca, arroz parboilizado beneficiado, farelo de arroz parboilizado e arroz parboilizado com casca), cultivado sob condições controladas de aplicação dos agrotóxicos. De acordo com os resultados obtidos, apenas clomazone e tebuconazole apresentaram concentrações dentro dos limites máximos estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* ($0,1 \text{ mg kg}^{-1}$) para o arroz beneficiado, na safra analisada. Estes autores destacaram que para o arroz integral, os níveis de contaminação podem ser maiores que os limites recomendados, uma vez que, para a maioria dos alimentos, resíduos de pesticidas sofrem uma redução significativa durante seu processamento.

Rodrigues et al. (2011) desenvolveram um método baseado na microextração em fase sólida no modo headspace (SPME-HS) seguida pela cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), para a determinação de pesticidas organofosforados (dichlorvos, sulfotep, demeton-S, dimpylate, disulfoton, parathion, methyl parathion, fenitrothion, chlorpyrifos e ethion) em amostras de leite de vacas expostas a estas substâncias. Resíduos de chlorpyrifos foram encontrados no leite de quatro vacas pulverizadas com formulações contendo este composto. Também foram detectados resíduos de ethion no leite de

duas vacas. Os resultados demonstraram também que, dentro de um período de 24 horas, foi possível detectar resíduos de chlorpyrifos abaixo do limite de quantificação ($13,7 \mu\text{g L}^{-1}$). Para o ethion, este pôde ser detectado abaixo do limite de quantificação ($6,5 \mu\text{g L}^{-1}$) até 72 horas após a pulverização do pesticida nas vacas.

Existem mais de 100 classes de substâncias dentre as quais os pesticidas estão incluídos. Algumas importantes são benzilureias, carbamatos, compostos organofosforados, organoclorados, piretróides, sulfonilureias e triazinas. Alguns compostos contêm halogênios, fósforo, enxofre ou nitrogênio (sendo que estes heteroátomos podem ter relevância para a detecção dos pesticidas), além de diferirem consideravelmente nas propriedades químicas e físicas (Alder et al., 2006). A Figura 2 apresenta alguns exemplos de pesticidas pertencentes a diferentes classes químicas.

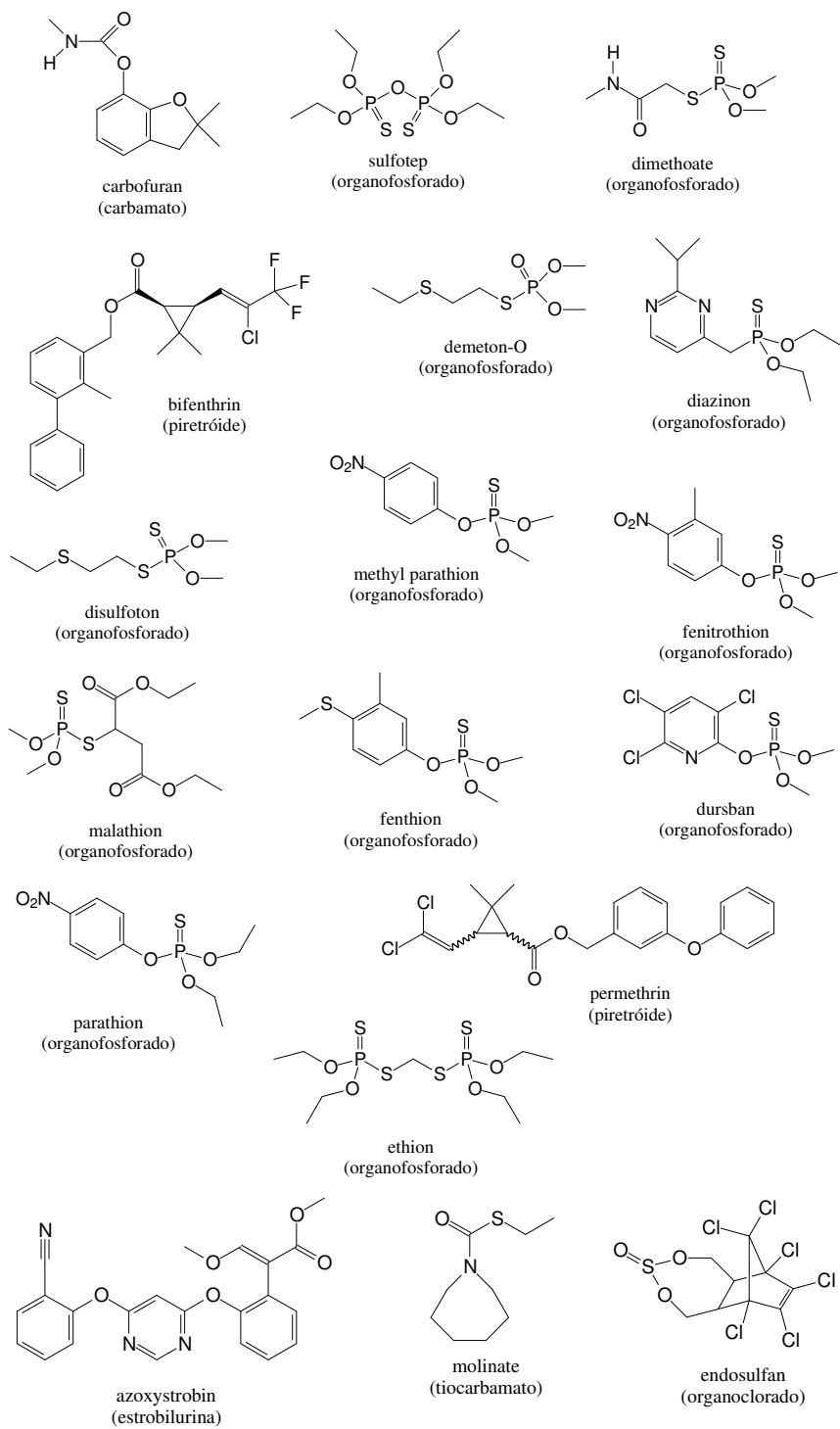


FIGURA 2 – Estruturas químicas dos pesticidas selecionados neste estudo

O uso de muitos desses compostos foi proibido devido à constatação do efeito cumulativo e prejudicial que ocorre pela transferência de pequenas quantidades ao longo das cadeias alimentares (Rissato et al., 2004). Há algumas décadas, pesticidas organoclorados foram intensivamente usados, em diversos países, na agricultura e também para o controle de vetores de doenças, tais como insetos. Porém, devido à persistência e bioacumulação desses compostos no meio ambiente, muitos países industrializados baniram o uso destes na década de 1970. Por este fato, pesticidas menos persistentes têm sido utilizados em grandes quantidades em muitos países e são frequentemente denominados de Pesticidas de Uso Corrente (CUPs) (Shunthirasingham et al., 2010).

Outro problema dos pesticidas é a falta de especificidade, ou seja, além de eliminar a praga-alvo elimina outras não nocivas às lavouras (Zarbin et al. 2009). Os pesticidas são moléculas sintetizadas capazes de afetar determinadas reações bioquímicas de insetos, microrganismos, animais ou plantas que se deseja controlar ou eliminar. Sendo assim, os efeitos da utilização de pesticidas nem sempre são isolados, pois as comunidades têm interações recíprocas de dependência e cooperação, e a ação sobre uma determinada população pode afetar todo o funcionamento de um ecossistema, já que determinados processos bioquímicos são comuns a diferentes seres vivos, fazendo com que possa atingir tanto os organismos alvo quanto outros seres do ambiente. (Spadotto, 2006).

Por apresentarem alta capacidade de bioacumulação, toxicidade, persistência e serem transportados a longas distâncias no meio ambiente, os pesticidas, assim como outras classes de compostos orgânicos, são denominados de Poluentes Orgânicos Persistentes (POP) (Park et al., 2011). As propriedades físico-químicas dos pesticidas podem influenciar tanto no transporte e destino desses compostos no ambiente quanto no comportamento dos mesmos durante as etapas de identificação e quantificação em diferentes matrizes, as quais envolvem técnicas de extração, limpeza (*clean up*) e análise instrumental (Silva et al., 2011).

Gebler et al. (2006) mencionam algumas propriedades físico-químicas importantes quando se trata da relação entre os pesticidas e o meio ambiente, bem como da escolha de um método de análise adequado para cada classe química. Dentre estas, pode-se destacar:

- *Pressão de vapor*: pode ser compreendida como a “solubilidade do produto no ar”; é levada em conta em relação ao vapor de uma substância em equilíbrio com sua fase pura condensada, seja ela líquida ou sólida;

- *Constante de Henry*: é a constante que explica a solubilidade dos gases na água; representa uma razão onde há a divisão da população de moléculas de um dado composto entre a fase gasosa e a fase aquosa da solução, determinando a compatibilidade relativa do composto para cada meio até o equilíbrio entre o vapor e a fase de solução;

- *Solubilidade em água*: pode ser definida como a abundância de um produto químico por unidade de volume na fase aquosa, quando a solução está em equilíbrio com o composto puro em seu atual estado de agregação (sólido, líquido ou gasoso), a uma temperatura e pressão específicas (normalmente, 25°C e 1 atm); é considerado um dos fatores-chave para determinar seus impactos no meio e o comportamento ambiental dos produtos;

- *Coefficiente de partição octanol/água*: é o coeficiente que gera estimativa direta da hidrofobicidade ou da tendência da partição de um determinado produto de um meio aquoso para um meio orgânico; é dado pela razão de partição do número de moléculas de uma substância entre dois meios não miscíveis (octanol e água), e é utilizado para avaliar o grau de transporte do produto entre estes meios.

A Tabela 3 apresenta as propriedades físico-químicas de alguns pesticidas de diferentes classes químicas.

TABELA 3 – Propriedades físico-químicas dos pesticidas selecionados neste estudo

Composto	Fórmula molecular	Classe química	Tipo	Pressão de vapor; 25°C (mPa)	Constante de Henry; 25°C (Pa m ³ mol ⁻¹)	Solubilidade em água; 20°C (mg L ⁻¹)	log K _{ow} - pH 7; 20°C
Azoxystrobin	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	estrobilurina	Fungicida	1,10x10 ⁻⁷	7,4x10 ⁻⁹	6,7	2,5
Bifenthrin	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂	piretróide	Inseticida Formicida Acaricida	0,0178	7,74x10 ⁻⁵	0,001	6,6
Carbofuran	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	carbamato	Inseticida Cupinicida Acaricida Nematicida	0,08	5,00x10 ⁻⁵	322	1,8
Demeton-O	C ₆ H ₁₅ O ₃ PS ₂	organofosforado	Inseticida Acaricida	não mencionado	não mencionado	330	0,47
Diazinon	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	organofosforado	Inseticida Acaricida	11,97	6,09x10 ⁻²	60	3,69
Dimethoate	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	organofosforado	Inseticida Acaricida	0,247	1,42x10 ⁻⁶	39800	0,704
Disulfoton	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₃	organofosforado	Inseticida Acaricida Fungicida	7,2	1,60x10 ⁻¹	25	3,95
Dursban (Chlorpyrifos)	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	organofosforado	Inseticida Formicida Acaricida	1,43	0,478	1,05	4,7
Endosulfan	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	organoclorado	Inseticida Acaricida	0,83	1,48	0,32	4,75

Fonte: IUPAC, 2013.

Continua...

TABELA 3 - ...continuação...

Composto	Fórmula molecular	Classe química	Tipo	Pressão de vapor; 25°C (mPa)	Constante de Henry; 25°C (Pa m ³ mol ⁻¹)	Solubilidade em água; 20°C (mg L ⁻¹)	log K _{ow} - pH 7; 20°C
Ethion	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄	organofosforado	Inseticida Acaricida	0,2	3,85x10 ⁻²	2	5,07
Fenitrothion	C ₉ H ₁₂ NO ₃ PS	organofosforado	Inseticida Formicida	0,676	9,86x10 ⁻³	19	3,32
Fenthion	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	organofosforado	Inseticida Formicida Acaricida Cupinicida	0,37	2,40x10 ⁻²	4,2	4,84
Malathion	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	organofosforado	Inseticida Acaricida	3,1	1,00x10 ⁻³	148	2,75
Methyl parathion	C ₈ H ₁₀ NO ₅ PS	organofosforado	Inseticida Acaricida	0,2	8,57x10 ⁻³	55	3,0
Molinate	C ₉ H ₁₇ NOS	tiocarbamato	Herbicida	500	6,87x10 ⁻¹	1100	2,86
Parathion	C ₁₀ H ₁₄ NO ₅ PS	organofosforado	Inseticida Acaricida	0,89	3,02x10 ⁻²	12,4	3,83
Permethrin	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	piretróide	Inseticida Formicida	0,002	1,89x10 ⁻¹	0,2	0,2
Sulfotep	C ₈ H ₂₀ O ₅ P ₂ S ₂	organofosforado	Inseticida Acaricida	14	4,50x10 ⁻¹	10	3,99

Fonte: IUPAC, 2013.

Diversos métodos analíticos têm sido propostos para a determinação simultânea de multirresíduos de pesticidas em matrizes aquosas. O desenvolvimento destes métodos é geralmente difícil já que os compostos apresentam diferentes graus de polaridade, solubilidade e volatilidade, bem como diferentes coeficientes de partição octanol-água (Tabela 3), dificultando a extração e análise destes (Menezes Filho et al., 2010). Com isso, os métodos de rotina para a determinação de resíduos de pesticidas no ambiente e em alimentos, normalmente, requerem muitas etapas de preparação das amostras antes da análise instrumental, tais como a extração, *clean-up* e concentração (Zhao et al., 2006).

2.2 Microextração com gota única (SDME)

A microextração com solvente (SME) é uma técnica de preparação por meio da extração e concentração de amostras líquidas, sólidas ou gasosas com a utilização de volumes de solventes menor ou igual a 100 µL. As técnicas que envolvem SME podem ser classificadas em duas categorias: as que expõem o solvente e as que o solvente encontra-se protegido por uma membrana. Aquelas cujo solvente se dispõe exposto incluem a microextração com gota única (SDME), microextração com gota única no modo *headspace* (HS-SDME), microextração líquido-líquido (LLME), microextração líquido-líquido-líquido (LLLME) e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME). Já aquelas onde há proteção do solvente incluem a microextração por fibra oca de 2 fases (HF(2)ME), frequentemente denominada de microextração em fase líquida (LPME), e a microextração por fibra oca de 3 fases (HF(3)ME) (Kokosa, 2013).

Vários estudos têm focado no desenvolvimento de métodos analíticos econômicos, miniaturizados e com baixos impactos ao meio ambiente para a preparação de amostras. Nesse sentido, a técnica de microextração com gota única (SDME) surgiu como o primeiro método de SME para a preparação de amostras, tendo como algumas vantagens a simplicidade, rapidez, baixo custo e ser praticamente livre de solventes (Psillakis & Kalogerakis, 2002; Zhao et al., 2006; Kokosa, 2013).

A SDME é uma implementação miniaturizada da extração líquido-líquido (LLE) convencional, em que apenas microlitros de solvente são utilizados em substituição às centenas de mililitros usados no método de LLE (Hou & Lee, 2004; Jin et al., 2012). Inicialmente, a técnica de SDME foi aplicada nos estudos de Jeannot & Cantwell (1997a) sendo, posteriormente, aperfeiçoada para uma forma mais simples de microextração em que uma gota de solvente orgânico permanecia presa na ponta de uma agulha de uma seringa usada em cromatografia a gás (Jeannot & Cantwell, 1997b; He & Lee, 1997).

Existem diferentes modos de microextração por solvente que se enquadram na categoria de microextração com gota única (SDME), os quais podem ser classificados de acordo com o número de fases coexistentes no estado de equilíbrio (duas ou três fases). Os modos de duas fases incluem a imersão direta (DI), de fluxo contínuo (CF), gota a gota (DD) e gota diretamente suspensa (DSD), enquanto para os de três fases consistem de *headspace* (HS), líquido-líquido-líquido (LLL) e uma combinação de LLL e DSD (Figura 3). Dentre estes, os modos mais comumente usados para a SDME são por *headspace* e por imersão direta (Jeannot et al., 2010).

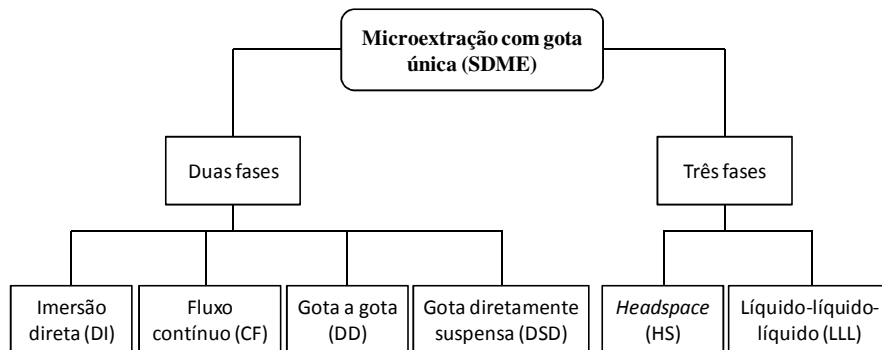


FIGURA 3 – Classificação da microextração com gota única (SDME). Adaptado de Jeannot et al., 2010.

Esta técnica de preparação de amostras se baseia no princípio de distribuição de analitos entre uma microgota de solvente orgânico, na ponta de uma agulha de uma microsseringa, e a fase aquosa (amostra). A microgota é exposta a uma amostra aquosa onde o analito é extraído para a gota (Figura 4). Após a extração, a microgota é recolhida para a microsseringa e injetada em instrumentos de cromatografia líquida ou a gás, para posterior análise (Psillakis & Kalogerakis, 2002; Zhao et al., 2006; Carlos et al., 2013). Assim, uma das principais vantagens da SDME é que a extração e pré-concentração dos analitos ocorrem simultaneamente em uma única etapa (López-Blanco et al, 2005; Pinheiro & De Andrade, 2009; Araújo et al., 2011).

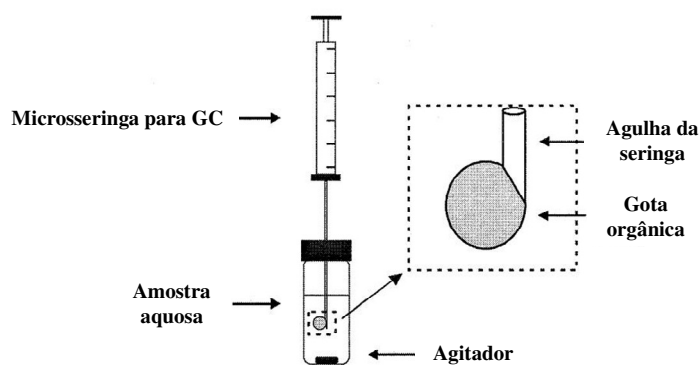


FIGURA 4 – Esquema de um sistema para SDME com imersão direta. Adaptado de Koning et al., 2009.

Uma vez que em SDME no modo de imersão direta o solvente de extração está diretamente em contato com a matriz aquosa, estes devem ser imiscíveis em água e, portanto, apresentarem uma natureza apolar ou fracamente polar. Em geral, os solventes usados neste modo são voláteis, tais como hexano ou tolueno, fazendo com que a cromatografia a gás seja a técnica de determinação final mais utilizada em conjunto com DI-SDME. Por outro lado, a cromatografia líquida e a eletroforese capilar têm sido diretamente compatíveis com a LLL-SDME e HS-SDME (Jeannot et al., 2010).

A SDME tem sido desenvolvida e aplicada para diferentes finalidades incluindo análises ambientais, higiene industrial, processos de monitoramento, análises clínicas, forenses, de alimentos (Pakade & Tewary, 2010; Lin et al., 2013).

Esta técnica vem sendo utilizada com sucesso na determinação de diferentes classes de substâncias, tais como compostos fenólicos (Rincón et al., 2011), compostos sulfurados (Xiao et al., 2006), aminas (Sha et al., 2010), como também para a extração de pesticidas (Zhao et al., 2006; Shrivastava & Wu, 2008; Zhang et al., 2008; Pinheiro et al., 2011; Pakade et al., 2013) em diferentes matrizes.

Uma nova abordagem para a análise de pesticidas em amostras de vegetais foi proposta por Zhang et al. (2008) utilizando uma mistura de solventes orgânicos para a execução da etapa de SDME seguida por GC-MS. Foi utilizada uma gota de 1 μ L formada pela mistura de *p*-xileno e acetona (8:2). Foram analisados nove pesticidas organoclorados em amostras de repolho, couve-flor e repolho chinês. A SDME mostrou-se como um método eficiente na determinação dos analitos nas amostras de vegetais, com recuperações relativas entre 63% e 100%, os quais foram detectados os pesticidas dicofol, em repolho, e dieldrin e DDE na couve-flor, com concentrações de 0,032 mg kg⁻¹, 0,25 mg kg⁻¹ e 0,17 mg kg⁻¹, respectivamente.

O tempo necessário para atingir o equilíbrio em SDME pode ser de alguns segundos a horas, dependendo do grau de agitação, volume das fases, área de contato interfacial e constante de distribuição de equilíbrio. Assim, para evitar tempos elevados de análise, SDME é frequentemente realizada em condições fora do equilíbrio. Mesmo nos casos em que o equilíbrio é atingido, é importante observar que a extração em SDME raramente é exaustiva, já que uma fração significativa de analito normalmente permanece na fase aquosa (amostra). Isto é consequência do pequeno volume de fase orgânica utilizado em comparação ao volume de fase aquosa, fazendo com que muitas vezes apenas uma quantidade negligenciável de analito seja removida da solução (Jeannot et al., 2010).

Apesar de não ser uma técnica de extração exaustiva, a SDME é baseada no princípio que a razão de equilíbrio da concentração do soluto entre a fase orgânica e a fase aquosa é constante. Matematicamente, este princípio pode ser expresso como:

$$K_d = \frac{C_{org}}{C_{aq}}$$

onde K_d é o coeficiente de distribuição, C_{org} é a concentração do soluto extraído na fase orgânica e C_{aq} é a concentração residual do soluto na fase aquosa. Desse modo, altos fatores de enriquecimento são obtidos devido ao elevado volume de amostra em relação ao volume da fase orgânica. Altos fatores de enriquecimento indicam boa eficiência de extração e ajudam a reduzir os limites de detecção (Pakade e Tewary, 2010).

Similarmente, o fator de enriquecimento pode ser calculado pela equação:

$$f = \frac{C_{org\ final}}{C_{aq\ inicial}}$$

onde f é o fator de enriquecimento, $C_{org\ final}$ é a concentração do analito na fase orgânica após o procedimento de extração e $C_{aq\ inicial}$ é a concentração inicial do analito na fase aquosa, obtidas por meio das curvas analíticas (Zanjani et al., 2007; Chang et al., 2010).

A eficiência de extração depende de vários fatores, incluindo a natureza do solvente orgânico, o tempo de exposição da microgota, temperatura, volume de amostra, agitação, volume da gota e força iônica, os quais podem ser otimizados para a aplicação da SDME em diferentes tipos de matriz (Pinheiro & De Andrade, 2009; Pakade & Tewary, 2010). Outros fatores que podem afetar a eficiência de extração são as propriedades dos analitos (volatilidade, polaridade e ionização), pureza do solvente de extração e seringa (Jeannot et al., 2010).

Pinheiro e De Andrade (2009) desenvolveram um procedimento por SDME para a análise de pesticidas organofosforados e piretróides (λ -cyhalothrin, methyl parathion, ethion e

permethrin) em água utilizando a cromatografia a gás com detector de ionização de chama (GC-FID). Neste estudo, alguns parâmetros que afetam significativamente o desempenho da SDME foram otimizados, tais como o solvente de extração, volume de solvente, tempo de extração e velocidade de agitação. Estes autores observaram que a melhor eficiência de extração dos analitos foi obtida utilizando tolueno como solvente de extração, tempo de extração de 30 minutos, velocidade de agitação de 300 rpm e volume da gota de solvente orgânico de 1 μ L.

Mais tarde, Pinheiro et al. (2011) estudaram outros parâmetros de otimização para a SDME, além dos mencionados acima, para a determinação dos pesticidas dimethoate, methyl parathion, ethion e permethrin em água. Foram avaliados o pH e a força iônica do meio, verificando que ambos não influenciaram significativamente na extração dos pesticidas utilizando as condições de análise propostas no trabalho.

Além de suas vantagens, a SDME apresenta como principais desvantagens a susceptibilidade da gota de se desprender da ponta da seringa durante o procedimento de extração, a limitação do tamanho da microgota e a volatilidade ou solubilidade do solvente de extração, as quais causam variações no volume da gota afetando a precisão do método. Outras limitações da técnica podem ser mencionadas como a exigência de cuidado e experiência do operador durante o manuseio e a necessidade de um passo adicional de filtração de matrizes complexas antes do procedimento de SDME já que pode haver comprometimento da estabilidade da gota para análises com imersão direta da microgota (Xu et al., 2007; Pinheiro & De Andrade, 2009; Carlos et al., 2013; Kokosa, 2013).

Um dos parâmetros que mais afeta a estabilidade da gota é a velocidade de agitação, já que uma maior velocidade proporciona uma maior eficiência de extração dos analitos. Diferentes inovações tais como modificações na ponta da seringa (Ahmadi et al., 2006) e mecanismos de proteção da gota na ponta da seringa (Qian & He, 2006; Ye et al., 2007) têm sido empregadas para que seja possível realizar extrações com maiores velocidades mantendo a estabilidade da gota.

Apesar da maioria dos estudos sobre SDME estarem focados na determinação de compostos orgânicos por meio da combinação desta técnica com métodos cromatográficos ou mesmo eletroforéticos, também têm sido desenvolvidos trabalhos na determinação de metais combinando a SDME com as diferentes vertentes em espectroscopia tais como a espectrometria de absorção atômica (AAS), plasma indutivamente acoplado a espectrometria de massas (ICP-MS) dentre outras (Jiang & Hu, 2008; Liang et al., 2008; Hu et al., 2013). Outras técnicas que têm empregado o acoplamento da SDME para diferentes finalidades incluem a espectrofotometria UV-vis, espectroscopia de infravermelho, espectrometria de massas e técnicas de detecção relacionadas (Andruch et al., 2012).

Líquidos iônicos (sais líquidos eletricamente neutros que possuem temperatura de fusão próxima ou abaixo da temperatura ambiente) têm sido utilizados como uma alternativa aos solventes orgânicos voláteis para a extração e pré-concentração de metais utilizando a SDME. Vale ressaltar que, devido a maior viscosidade dos líquidos iônicos em comparação aos solventes orgânicos comuns, há possibilidade de se conseguir maior estabilidade da microgota na ponta da agulha da seringa garantindo, conseqüentemente, maior reprodutibilidade (Martinis et al., 2010).

Tem sido relatado o desenvolvimento de um procedimento de pré-concentração de chumbo por SDME, utilizando como líquido iônico 1-butil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato [C₄MIM][PF₆], para a análise do metal em amostras de água e alimentos utilizando espectrometria de absorção atômica eletrotérmica (ET-AAS). Após a obtenção das melhores condições de extração, foram obtidos limite de detecção de 0,015 µg L⁻¹ e fator de enriquecimento de 76, sendo aplicado com sucesso na análise de materiais de referência certificados e várias amostras reais (Manzoori et al. 2009).

Outra aplicabilidade dos líquidos iônicos baseada na microextração com gota única em conjunto com a espectrometria de absorção atômica eletrotérmica (ET-AAS) tem sido a determinação de cádmio em material padrão de referência de arroz e amostras reais de água. Foi obtido um valor de 0,015 µg L⁻¹ para o limite de detecção do analito, com um fator de enriquecimento da ordem de 42. O método mostrou-se eficiente para a análise de cádmio em amostras de água e material certificado de arroz, tendo valores de recuperação variando de 96,5% a 106%, para as amostras de água (Wen et al. 2013).

Anteriormente, a análise por plasma indutivamente acoplado a espectrometria de massas (ICP-MS) também já havia sido aplicada em conjunto com a SDME para a determinação de metais. Limites de detecção de 4,6 pg mL⁻¹ e 2,9 pg mL⁻¹ foram obtidos para os metais Cd e Pb, respectivamente, pela análise por vaporização eletrotérmica em ICP-MS. A SDME possibilitou obter fatores de enriquecimento de 140 vezes e 190 vezes para ambos os metais, respectivamente (Li et al., 2006).

Além dessas, técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos também foram usadas na especiação de mercúrio após a separação e pré-concentração das espécies por SDME baseada em líquido iônico (Pena-Pereira et al., 2009).

Algumas vezes são necessárias modificações estruturais em compostos de diferentes classes químicas a fim de permitir a análise destas substâncias em diferentes instrumentos analíticos. Nesse sentido, a derivatização é empregada com frequência, especialmente em cromatografia, para converter substâncias de diferentes classes em compostos voláteis capazes de serem analisados por cromatografia a gás ou em compostos fluorescentes para posterior

análise por HPLC-FLD. Desse modo, técnicas de derivatização já vêm sendo empregadas com sucesso em combinação com técnicas de microextração, tais como a SDME (Lin et al., 2013).

Um método para a determinação de herbicidas ácidos em amostras de água foi desenvolvido por Araújo et al. (2011) onde, após a realização de um procedimento de derivatização *in situ*, os analitos foram extraídos por SDME e analisados por GC-MS, obtendo-se limites de detecção na faixa de 1,8 a 3,0 ng L⁻¹. Os resultados obtidos com amostras fortificadas mostraram a aplicabilidade do método para a determinação desta classe de compostos em matrizes aquosas.

Como já foram mencionadas, as primeiras aplicações da SDME foram realizadas por meio da imersão direta de uma gota de um solvente imiscível em uma solução aquosa (DI-SDME) para a extração de analitos orgânicos (Figura 4). Entretanto, nos últimos anos, a SDME por headspace (HS-SDME) tem sido desenvolvida para a extração de analitos voláteis (Carlos et al., 2013). A HS-SDME é principalmente aplicada para analitos voláteis, já que estes são mais fáceis do que os semivoláteis para evaporar da matriz, apesar de ser uma técnica aplicada para ambos os tipos de analitos, voláteis e semivoláteis (Yang et al., 2013). Neste modo, os analitos são distribuídos entre três fases: a amostra aquosa, o *headspace* e a gota orgânica (Xu et al., 2007), conforme esquematizado na Figura 5.

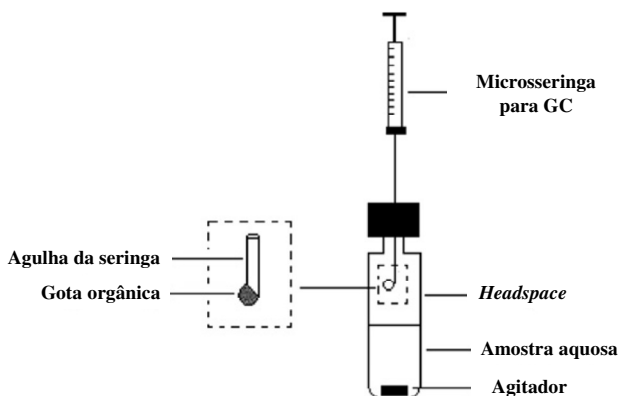


FIGURA 5 - Esquema de um sistema para SDME no modo *headspace*. Adaptado de Xu et al., 2007.

A similaridade de operação entre SPME e SDME sugere que amostradores automáticos utilizados em SPME também possam trabalhar com SDME. Assim, DI-SDME e HS-SDME podem ser totalmente automatizados utilizando um amostrador automático controlado por um computador programável. Embora a SDME tenha sido aplicada manualmente, com boa reprodutibilidade e precisão, na maioria dos estudos, a automação é uma necessidade real caso

seja necessária a análise de um número grande de amostras, como em laboratórios comerciais (Wood, et al., 2004; Koning et al., 2009; Kokosa et al., 2013).

Há relatos de que os primeiros resultados para SDME no modo *headspace* utilizando um autoamostrador foi empregado na análise de BTEX com uma gota de 2 μL de hexadecano e uma microseringa de 10 μL (Wood, et al., 2004; Koning et al., 2009).

Um método completamente automatizado foi desenvolvido por Lee & Lee (2011) envolvendo a extração das amostras, injeção dos extratos e derivatização dos analitos para a análise de pesticidas carbamatos em amostras de água. Foi utilizado um autoamostrador para a execução das etapas de preparação das amostras. Foram alcançados baixos limites de detecção ($0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ a $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$) para os pesticidas, fatores de enriquecimento entre 57 e 138 e elevadas recuperações relativas (81% a 125%) demonstrando a viabilidade de um sistema analítico completo envolvendo as etapas de preparação de amostras (SDME) e análise (GC-MS) de forma automatizada.

Park et al. (2012) utilizaram HS-SDME automatizado acoplado à eletroforese capilar (CE) para a determinação de clorofenóis em amostras de vinhos enriquecidas. O método proporcionou a obtenção de fatores de enriquecimento variando de 1900 a 3400, mostrando sua maior eficiência de extração e pré-concentração comparada à outros métodos analíticos como microextração em fase sólida no modo *headspace*, o qual proporcionaram fatores de enriquecimento na faixa de 30 a 42.

Um sistema de SDME em linha com a cromatografia eletrocinética micelar de varredura (MEKC) foi empregado por Gao et al. (2012) no desenvolvimento de um método para a determinação de alcaloides em urina humana. O método se mostrou promissor para a análise dos analitos em urina, sendo capaz de extrair seletivamente três alcaloides das amostras sem interferentes da matriz, conseguindo limites de detecção entre $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ e $1,5 \text{ ng mL}^{-1}$.

Diante disso, o aperfeiçoamento dos métodos analíticos utilizando a SDME tem apresentado grande importância para que seja possível a determinação eficiente de analitos de diferentes classes químicas a níveis traços em diferentes tipos de matrizes complexas.

2.3 Bebidas

2.3.1 Água de coco

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma planta tropical cultivada nas áreas equatorial e sub-equatorial, o qual produz uma bebida doce e refrescante proveniente da parte interna de seus frutos imaturos denominada de água de coco ou suco de coco, não devendo ser confundida

com o leite de coco que é um líquido branco oleoso extraído da semente fresca ralada. Apesar de ser uma planta de clima equatorial e sub-equatorial, coqueiros têm sido plantados em número crescente em zonas áridas e semi-áridas do Nordeste brasileiro, onde alguns estudos sobre irrigação de campo têm sido realizados (Steiner & Desser, 2008; Prades et al., 2011; Prades et al., 2012).

A água de coco é uma bebida isotônica natural e uma fonte rica em açúcares, sais, vitaminas, minerais e aminoácidos, podendo ser servida diretamente como uma bebida para saciar a sede. É uma bebida límpida, incolor, doce e com sabor levemente ácido, com pH podendo variar de 4,2 a 6,0. É comercializada na sua forma natural ou após processamento, a qual é submetida a várias etapas de esterilização e adição de conservantes (Awua et al., 2011; Young et al., 2009; Deme et al., 2012). Apresenta em sua composição vitaminas do complexo B, açúcares (tais como glicose e frutose), álcoois de açúcares, vitamina C, ácidos orgânicos (ácido tartárico, ácido cítrico, ácido fólico e ácido málico), proteínas, gorduras, fito-hormônios e outros elementos nutricionalmente importantes como o potássio (Awua et al., 2011; DebMandal & Mandal, 2011).

A bebida se origina no fruto após um mês e meio de desenvolvimento do mesmo e, quando atinge seu volume máximo, corresponde a 25% do peso do fruto (Chidambaram et al., 2013).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2009), a água de coco pode ser classificada como:

- a) *Água de coco resfriada: produto envasilhado logo depois de ser extraído e, sem descontinuidade, submetido a um processo adequado de resfriamento;*
- b) *Água de coco pasteurizada: é o produto submetido a um processo adequado de pasteurização e posterior resfriamento;*
- c) *Água de coco congelada: é o produto submetido a um processo adequado de congelamento, podendo ou não ser pasteurizado;*
- d) *Água de coco esterilizada: é o produto submetido a um processo adequado de esterilização;*
- e) *Água de coco concentrada: é o produto submetido a um processo adequado de concentração, cujo teor de sólidos solúveis seja de, no mínimo, 6,75°Brix;*
- f) *Água de coco desidratada: é o produto submetido a um processo adequado de desidratação, cujo teor de umidade seja igual ou inferior a 3%;*
- g) *Água de coco reconstituída: é o produto submetido a um processo adequado de reidratação, a partir do produto definido nos itens e e f, atendendo aos Padrões de Identidade e Qualidade previstos pela legislação vigente.*

Devido aos seus inúmeros usos, o coqueiro é conhecido em muitas regiões como “árvore da vida” (Prades et al., 2011). Durante muitos anos, acreditou-se na utilização dos produtos provenientes dos coqueiros para diferentes finalidades medicinais tais como anti-bronquite, antipirético, antigengivite, dentre outras. Atualmente, estudos vêm sendo realizados para avaliar seu uso como eletrólito natural, antibacteriano, antioxidante, imunostimulador, dentre muitos outros (DebMandal & Mandal, 2011; Chidambaram et al., 2013). Em casos de emergência em regiões remotas e durante a Segunda Guerra Mundial, a água de coco foi usada como hidratação intravenosa em curto prazo (Prades et al., 2011).

Diante de diversos benefícios que a água de coco pode trazer para a saúde, a classe das citocininas representa um dos grupos de substâncias químicas mais importantes presentes na bebida, devido às suas funções biológicas. Esta classe de substâncias apresenta propriedades potencialmente anticancerígenas, trazendo perspectivas para a busca da cura de diferentes tipos de câncer (Young et al., 2009).

Estima-se que as plantações de coqueiros ocupam uma área em torno de 11,2 milhões de hectares em todo o mundo, distribuídos em mais de 90 países, onde os principais produtores são a Indonésia, Filipinas, Índia e o Brasil, ocupando a quarta posição (Carr, 2011).

O coqueiro foi introduzido no Brasil através do Estado da Bahia, o que justifica sua denominação como coco-da-baía, com material proveniente da Ilha de Cabo Verde (Aragão et al., 2009). A partir da Bahia, o coqueiro disseminou-se pelo litoral nordestino, especialmente por ser uma frutífera típica de clima tropical, onde encontrou condições favoráveis para o cultivo e, posteriormente, se adaptou a outras regiões do país, podendo ser encontrado, nos dias atuais, em quase todos os Estados brasileiros (Martins & Jesus Júnior, 2011).

Martins & Jesus Júnior (2010) citam que o Brasil possui cerca de 280 mil hectares cultivados com coqueiros, com uma produção próxima a 2 bilhões de frutos, verificando-se um aumento significativo na produção a partir do final da década de 1990 (Figura 6).

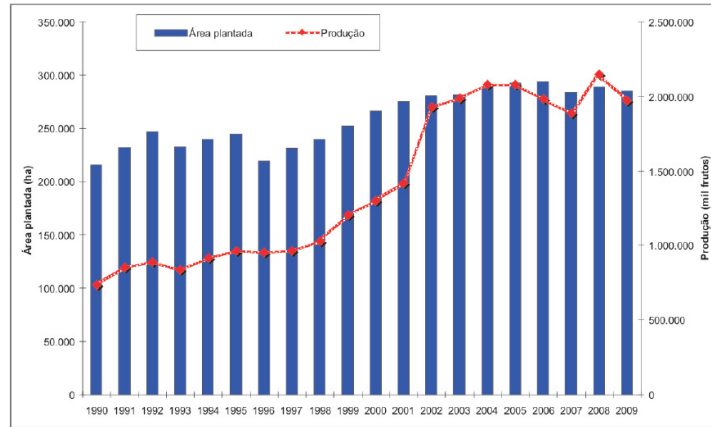


FIGURA 6 – Área plantada e produção de coco no Brasil. Fonte: Martins & Jesus Júnior, 2010.

Poucas informações atuais dizem respeito sobre o consumo de água de coco no Brasil, havendo uma estimativa de que a comercialização informal do coco corresponda a 80% do volume total consumido no país (Martins & Jesus Júnior, 2011).

Os coqueiros são frequentemente atacados por vários insetos e/ou pragas reduzindo, assim, a sua produtividade. Para melhorar a produção de coco, muitas vezes recomenda-se a utilização de pesticidas em diferentes formas, seja por meio da pulverização sobre as folhas ou pela injeção através dos sistemas do caule e da raiz. Assim, a água de coco pode ser contaminada com resíduos de pesticidas por meio dos diferentes métodos de aplicação dessas substâncias, constituindo um risco à saúde dos consumidores devido à sua potencial toxicidade (Deme et al., 2012).

Há relatos de que os coqueiros podem ser infectados por mais de 100 pragas, entre os quais a lagarta do coco de cabeça preta (*Opisina arenosella*) e o gorgulho vermelho (*Rhyncophorus ferrugineus*) podem ser as mais graves (Ranasinghe et al., 2003).

Acredita-se que a injeção de pesticidas no tronco de coqueiros se iniciou em meados dos anos 1950 e ainda vem sendo continuada em vários países do Sul da Ásia. Deme et al. (2012) menciona que estudos têm mostrado que a contaminação da água de coco por monocrotophos tem ocorrido devido à injeção desta substância no tronco dos coqueiros, enquanto resíduos de carbofuran e o seu metabólito 3-hydroxycarbofuran foram encontrados em amostras de árvores submetidas à pulverização dos mesmos sobre as folhas. Desse modo, estudos têm relatado que a água de coco pode ser contaminada por qualquer um dos meios de tratamento, ressaltando que a presença de resíduos desses compostos na bebida pode constituir um risco para a saúde dos consumidores devido a potencial toxicidade dos mesmos (Ranasinghe et al., 2003; Ogawa et al., 2006; Deme et al, 2012).

São utilizados pesticidas de diferentes classes químicas para o controle de pragas na cultura do coqueiro, com destaque para os carbamatos (carbofuran), piretróides (bifenthrin), organofosforados (dimethoate, malathion, methyl parathion e trichlorfon), dentre outros (Embrapa, 2002). Apesar do uso intensivo de pesticidas, o governo brasileiro ainda não tem um limite máximo estabelecido para resíduos de pesticidas em água de coco (Santos et al., 2012).

A pesquisa atual sobre água de coco é escassa e se concentra principalmente em seus usos específicos, na composição bioquímica e nas técnicas de preservação, devendo-se considerar que se trata de um meio complexo, devido às suas propriedades físicas e químicas (Prades et al., 2011).

Diante disso, mesmo com os avanços analíticos recentes, há uma carência em encontrar na literatura aberta uma metodologia analítica que tenha identificado e quantificado pesticidas em água de coco já que tem sido mencionada apenas a identificação de malathion. Deme et al. (2012) propuseram um método para a determinação de pesticidas organofosforados (acephate, monocrotophos, dimethoate, malaoxon, dichlorvos, malathion, phenthoate, parathionethyl, chlorfenvinfos, quinalphos, diazinon, phosalone, profenofos, ethion, chlorpyrifos) em amostras de água de coco baseado em extração em fase sólida (SPE) e análise por cromatografia líquida com detector de massas tandem (LC-ESI-MS/MS). Foram observados limites de detecção na faixa de 0,1 a 1,5 ng mL⁻¹ e limites de quantificação entre 0,5 e 2,0 ng mL⁻¹, com porcentagens de recuperação de 80% a 115%. Após a aplicação do método em amostras reais de água de coco, foi constatada apenas a presença de malathion com concentrações que variaram de 24 a 45 ng L⁻¹, possível somente após a execução de diferentes etapas de pré-concentração.

Santos et al. (2012) desenvolveram um método para a determinação de três resíduos de pesticidas (lufenuron, teflubenzuron e bifenthrin) em água de coco liofilizada utilizando a técnica de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), seguida pela análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-vis (HPLC-UV). Após a otimização das condições de extração, os melhores resultados foram obtidos usando 0,5 g de água de coco liofilizada, 2,5 g do sorvente dispersante (C₁₈) e 20 mL de acetonitrila como eluente. Foram obtidos limites de detecção variando de 0,04 a 0,05 mg kg⁻¹ e limite de quantificação de 0,1 mg kg⁻¹. Apesar de serem constatadas boas médias de recuperação (71% a 116%), nenhum dos pesticidas estudados foi encontrado nas amostras de água de coco analisadas.

Em estudo anterior, Silva et al. (2008) já haviam proposto um método também baseado em MSPD para a determinação de pesticidas (dimethoate, malathion, lufenuron, carbofuran, 3-hydroxycarbofuran, thiabendazole, difenoconazole e trichlorfon) em polpa de coco, obtendo-se limites de detecção (0,02 a 0,17 mg kg⁻¹) e quantificação (0,15 a 0,25 mg kg⁻¹) relativamente próximos ao estudo mencionado anteriormente para o método proposto em água de coco.

Entretanto, não foi encontrado nenhum dos pesticidas estudados em concentrações acima do limite de detecção em amostras reais de polpa de coco obtidas de estabelecimentos comerciais da cidade de Aracaju-SE, originárias da agricultura convencional.

Devido a preocupação com relação à aplicação de diferentes aditivos químicos para o controle de pragas dos coqueiros e a possibilidade de transferência dessas substâncias para os produtos provenientes dessa vegetação, tais como a água de coco, torna-se imprescindível o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e eficientes para a detecção destas substâncias nesta matriz a fim de minimizar e controlar problemas relacionados à saúde causados pela ingestão destas substâncias.

2.3.2 Vinho

De acordo com a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2012), o vinho é definido como a bebida resultante exclusivamente por fermentação alcoólica, completa ou parcial, de uvas frescas esmagadas ou trituradas ou de mostos de uvas, não devendo apresentar graduação alcoólica inferior a 8,5% v/v. Entretanto, levando-se em consideração o clima, solo, variedade de uva, além de outros fatores qualitativos e tradições, o teor alcoólico mínimo pode ser reduzido a 7% v/v por legislação específica para a região de produção considerada.

As principais etapas do processo de vinificação são representadas pelo esmagamento da uva, fermentação do mosto, envelhecimento e engarrafamento do vinho, havendo diferenciação na vinificação para a produção de vinho branco (vinificação branca) e vinho tinto (vinificação vermelha). Basicamente, a diferença na produção encontra-se pela presença de antocianinas (compostos responsáveis pela cor dos vinhos tintos e estão contidas, principalmente, nas cascas das uvas) as quais são extraídas das cascas das uvas durante o processo de maceração. Conseqüentemente, se a fermentação é realizada na ausência das cascas das uvas (vinificação branca), o vinho obtido será branco independente da cor das uvas utilizadas. Por outro lado, se a vinificação é realizada com o mosto e as cascas das uvas, realiza-se a vinificação vermelha (no caso da utilização de uvas vermelhas) (Baiano et al., 2013).

A Figura 7 apresenta um esquema com as principais etapas para a produção de vinho branco e vinho tinto.

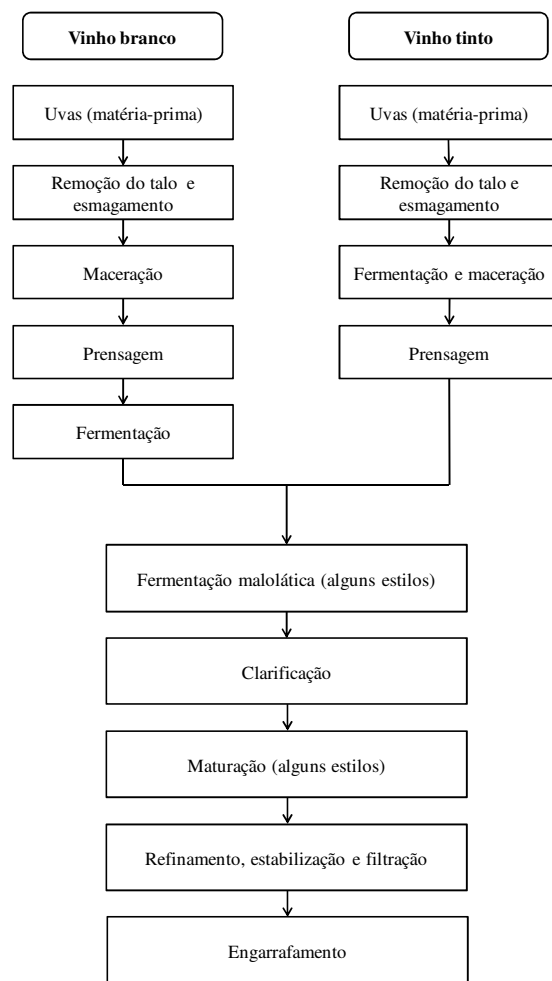


FIGURA 7 - Esquema das etapas que envolvem a produção de vinho branco e vinho tinto. Adaptado de De Villiers et al., 2012.

Segundo o Relatório Estatístico da Vitivinicultura Mundial de 2013, publicado pela International Organisation of Vine and Wine (OIV, 2013), a produção mundial de vinho, no ano de 2012, foi estimada em 252 milhões de hectolitros, com um consumo de 243 milhões de hectolitros. Os cinco maiores produtores da bebida foram França, Itália, Espanha, Estados Unidos e China, estando Portugal (tradicional país na produção de vinhos de qualidade) na 11ª posição, enquanto o Brasil encontra-se na 14ª.

No Brasil, algumas regiões se destacam na produção de vinhos, as quais se apresentam como regiões vinícolas o Rio Grande do Sul, Santa Catarina, região de São Roque (SP), Sul de Minas e Vale do São Francisco, conforme apresentado na Figura 8. Dentre estas, o Rio Grande do Sul se destaca devido às condições climáticas mais favoráveis para a viticultura de qualidade. Outra região que vem se destacando é o Vale do São Francisco, localizado entre os

Estados da Bahia e Pernambuco. Esta região vem despertando a curiosidade mundial por estar se tornando um dos importantes produtores vitivinícolas do país, sendo responsável por 99% da uva de mesa exportada pelo Brasil e pela produção de 5 milhões de litros de vinho/ano, aproximadamente (Academia do Vinho, 2013).

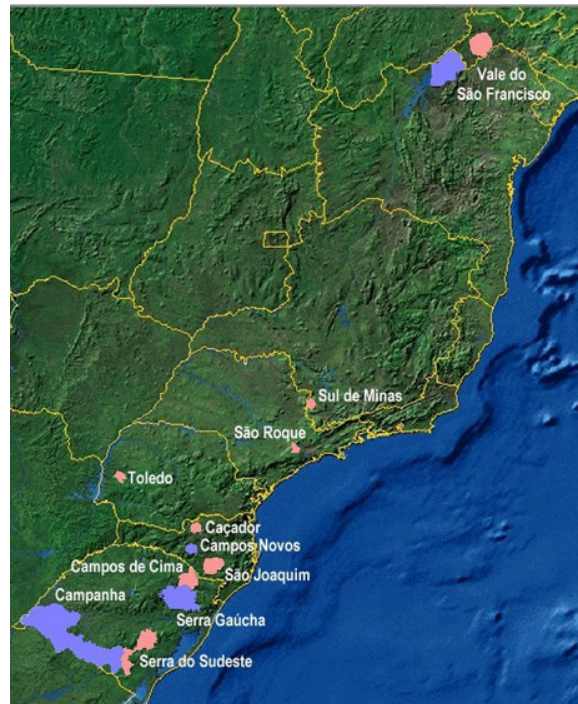


FIGURA 8 – Regiões vinícolas do Brasil. Fonte: Academia do Vinho, 2013.

O vinho é composto por centenas de substâncias cuja complexidade se origina de três importantes fontes: a matéria-prima (proveniente de uma diversificada variedade de uvas, que se desenvolvem em diferentes formações rochosas, climas e altitudes), a fermentação (processo realizado pela cooperação entre diferentes microrganismos na fabricação da bebida) e o processo de envelhecimento (que varia em função de diferentes métodos de armazenamento, o tamanho e a composição dos recipientes de armazenamento, origem dos barris e tempo de armazenamento) (Fisher, 2007; Gomez et al., 2012). Os principais grupos de substâncias que constituem o vinho são açúcares, alcoóis, ácidos orgânicos, sais de ácidos minerais e orgânicos, compostos fenólicos, pigmentos, substâncias nitrogenadas, pectinas, compostos voláteis e aromáticos (aldeídos, cetonas e ésteres), vitaminas, sais e anidrido sulfuroso (Moraes & Locatelli, 2010).

Além de seus benefícios relacionados à redução de doenças cardiovasculares, o consumo moderado de vinho tem sido associado a outros resultados positivos à saúde devido às

suas amplas propriedades biológicas tais como sua atividade antioxidante, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, anti-mutagênica e as atividades antitumorais de seus componentes (Castellarin et al., 2007; Gomez et al., 2012). Como o vinho é uma mistura complexa, acredita-se que um grande número de componentes químicos, bem como seus metabólitos, atua em sinergia trazendo benefícios à saúde humana, com destaque para os componentes fenólicos da bebida. Em contrapartida, há relatos a respeito da presença de diferentes contaminantes em vinhos, os quais representam riscos potenciais para a saúde humana. Dentre estes contaminantes, citam-se a presença de resíduos de pesticidas, ácido acético, bactérias, fungos, metais, micotoxinas, dentre outros (Guilford & Pezzuto, 2011).

Normalmente, as plantações de uvas são tratadas por meio da aplicação de pesticidas no estágio final da vegetação para prevenir as uvas contra o ataque de pragas, podendo ocorrer pouco antes da época de colheita (Flamini & Panighel, 2006). Estas substâncias têm sido aplicadas em plantações de uvas em todo o mundo com o objetivo de proteger as videiras contra doenças causadas por insetos, fungos, plantas daninhas e outros agentes (Carpinteiro et al., 2010; De Villiers et al., 2012). Diante disso, têm-se observado que as vinícolas estão se tornando cada vez mais dependentes de produtos químicos sintéticos, tais como os pesticidas, para obter vantagem competitiva diante do mercado. Embora haja produtos naturais e técnicas alternativas ao uso de pesticidas, muitos produtores têm optado pelo emprego destas substâncias nas lavouras de uvas devido ao menor custo, tempo e facilidade de aplicação (Christ & Burritt, 2013).

Pesticidas de diferentes classes químicas têm sido utilizados largamente no tratamento de pragas de uvas usadas para vinificação tais como azoxystrobin, carbendazim, cymoxanil, cyprodinil, dichlofluanid, fenhexamid, folpet, fludioxonil, metalaxyl, thiophanate methyl, penconazol, pyrimethanil, procymidone, vinclozolin, mepanipyrim, fluazinam e chlorpyrifos (Jin et al, 2012).

O uso indiscriminado de pesticidas na agricultura tem despertado grande preocupação com relação à saúde e segurança dos consumidores uma vez que durante o processo de produção do vinho, resíduos de pesticidas provenientes das uvas podem passar para o mosto e, conseqüentemente, à bebida, podendo representar um risco toxicológico ao consumidor (Garbi et al., 2010). Alguns pesticidas provenientes de uvas podem ser removidos, durante o processo de vinificação, por meio de diferentes mecanismos de dissipação (tais como sorção, degradação, entre outros). No entanto, resíduos de pesticidas podem ser encontrados no produto final dependendo de alguns fatores como as propriedades físico-químicas das substâncias, solubilidade em água e em misturas etanol:água, e as operações de vinificação (Carpinteiro et al., 2010; Sen et al., 2012).

Nesse sentido, não há eliminação total dos resíduos de algumas destas substâncias durante a produção da bebida. Sendo assim, apesar dos teores de pesticidas nos vinhos apresentarem-se significativamente mais baixos que em uvas, é de extrema importância a preocupação quanto aos riscos que a possível presença de resíduos destas substâncias no produto final pode trazer para a saúde (Garbi et al., 2010; Martins et al., 2011).

A ocorrência e concentração de resíduos de pesticidas em uvas e, conseqüentemente, em vinhos dependem do tipo de praga que ataca as videiras de cada região, do tipo de cultivo das uvas, da concentração de pesticidas utilizada na pulverização, número de aplicações, período de tempo e condições climáticas da última pulverização até a colheita (Cus et al., 2010b; Sen et al., 2012).

Em um acompanhamento da concentração de resíduos de 117 pesticidas durante todo o processo de vinificação foi constatado que boscalid e phosalone foram as substâncias mais persistentes durante o período de amadurecimento das uvas. Além disso, as concentrações de pesticidas no mosto e no vinho apresentaram-se significativamente reduzidas durante a separação das fases sólida e líquida no processo de vinificação. Ficou evidente que, devido à insolubilidade de alguns pesticidas, as maiores concentrações destes compostos foram detectadas no bolo, seguidas pelas uvas esmagadas e pelo mosto. Assim, os principais procedimentos que reduzem significativamente resíduos de pesticidas durante o processo de vinificação são a prensagem e a separação das borras do vinho após a fermentação alcoólica. No processamento de uvas brancas a clarificação do mosto é também um fator importante na redução significativa de pesticidas (Cus et al., 2010b; Sen et al., 2012).

Além disso, durante o processo de fermentação, as leveduras podem influenciar nos níveis de pesticidas no vinho (reduzindo-os ou adsorvendo-os sobre as borras), onde a persistência dessas substâncias depende da característica química dos ingredientes ativos, fenômenos de fotodegradação, termodegradação e degradação enzimática (Caboni & Cabras, 2010).

Análises de pesticidas em amostras de vinho mostraram que a presença destas substâncias no vinho pode estar relacionada ao tipo de procedimento de produção da bebida, seja para a obtenção de vinho tinto ou vinho branco. Os autores sugerem que a maceração das cascas das uvas (vinificação vermelha) pode contribuir para o aumento da quantidade de resíduos de pesticidas transferidos para a bebida devido ao fato de que a presença de pesticidas nos vinhos tintos analisados foi significativamente maior que nos vinhos brancos (Duca et al., 2012).

Pelo fato da concentração de pesticidas em vinhos ser significativamente inferior que em uvas, métodos para detectar resíduos dessas substâncias na bebida devem ser bastante

eficientes e sensíveis (Flamini & Panighel, 2006). Neste sentido, o conhecimento das concentrações de pesticidas em vinho possibilita avaliar os riscos da exposição humana por meio da ingestão da bebida bem como as taxas de dissipação durante a elaboração do vinho (Fontana et al., 2011).

Na análise de pesticidas em amostras de vinhos, deve-se levar em consideração, além da complexidade da matriz, a natureza do pesticida. As técnicas de cromatografia líquida ou cromatografia a gás utilizando diferentes tipos de detectores têm sido empregadas para a determinação destas substâncias em alimentos. Em termos de seletividade e sensibilidade, a espectrometria de massas, acoplada às técnicas cromatográficas citadas, vem sendo utilizada como uma das ferramentas de detecção mais eficientes na análise de pesticidas em alimentos (Flamini & Panighel, 2006; Carpinteiro et al., 2010).

Flamini & Panighel (2006) citam que um dos primeiros métodos reportados na literatura, utilizando a espectrometria de massas para a determinação de pesticidas em vinhos, foi utilizando GC-MS-EI. Neste trabalho foi realizada a análise de procimydone por meio de extração líquida com hexano e usando aldrin como padrão interno. Comparando os resultados obtidos tanto usando detector de captura de elétrons (ECD) quanto o espectrômetro de massas, foram encontrados os mesmos valores para o limite de quantificação ($2 \mu\text{g L}^{-1}$), possibilitando a abertura para o desenvolvimento de outros métodos para a análise de pesticidas em bebidas tendo como ferramenta a espectrometria de massas (Wynn et al., 1993).

Tradicionalmente, a preparação de amostras para a análise de pesticidas em vinhos é efetuada por meio de extração líquido-líquido (LLE), utilizando solventes orgânicos, ou por meio de extração em fase sólida (SPE) (Carpinteiro et al., 2010).

Duca et al. (2012) aplicaram a extração líquido-líquido (LLE) para a análise de pesticidas em vinhos. Estes autores utilizaram solventes orgânicos, como hexano e diclorometano, para a extração e pré-concentração de pesticidas de diferentes classes, tais como organoclorados e organofosforados, respectivamente. Após a etapa de tratamento das amostras, os pesticidas foram analisados em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas, sendo detectados resíduos dos pesticidas metalaxyl e seu metabólito mefenoxam, os quais são ingredientes ativos usados na formulação de fungicidas sistêmicos aplicados nas videiras.

Angioni e Dedola (2013) realizaram um monitoramento da concentração de 30 pesticidas em vinhos provenientes da Sardenha (Itália). Este estudo foi realizado por meio da análise dos pesticidas utilizando a cromatografia a gás com detector de massas Ion Trap (GC-ITMS) após procedimentos de preparo de amostras por meio da LLE, com o uso de uma mistura dos solventes orgânicos acetato de etila:hexano (1:1). O método proposto apresentou limites de

detecção que variaram de 0,005 a 0,015 mg L⁻¹ e limites de quantificação de 0,01 a 0,05 mg L⁻¹, além de valores de recuperação na faixa de 75 a 116%. Entretanto, dos pesticidas analisados, somente 11 foram encontrados nas amostras analisadas, em concentrações abaixo do limite de quantificação para os respectivos compostos.

O método por extração em fase sólida (SPE) automatizada foi aplicado em diferentes tipos de vinhos fortificados (branco, tinto e rosé) com 16 pesticidas organoclorados, seguida pela análise por GC-MS/MS (cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas tandem), obtendo-se limites de detecção que variaram de 1,7 a 9,7 ng L⁻¹, dependendo do tipo de vinho e composto analisados (Pérez-Serradilla et al., 2010).

A microextração em fase sólida (SPME) também tem sido um dos métodos de preparação de amostras utilizados para a análise de pesticidas em vinhos. Martins et al. (2011) propuseram um método para a determinação de 24 resíduos de pesticidas em vinhos tinto e branco aplicando a SPME seguida pela análise por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas tandem (GC-MS/MS), tendo sido analisados pesticidas como diazinon, fenitrothion, malathion, dursban (chlorpyrifos), fenthion e azoxystrobin em comum a este estudo. Para o procedimento de microextração, foi utilizada fibra com fase composta por polidimetilsiloxano (PDMS), obtendo-se limites de detecção que variaram de 0,05 a 72,35 µg L⁻¹ e limites de quantificação na faixa de 0,16 a 219,23 µg L⁻¹. Neste estudo, nenhum resíduo dos pesticidas analisados não foi detectado nas amostras, apesar de terem sido constatados bons valores de recuperação (69% a 127,5%) pelo método proposto.

Trabalhos realizados utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) e a cromatografia de alta eficiência em camada fina com detecção de arranjo de diodos (HPTLC-DAD) mostraram que foram obtidas recuperações médias entre 69% e 119%, para dez pesticidas em vinho, usando a extração em fase sólida (SPE) como método de tratamento das amostras. Os resultados encontrados apresentaram-se na faixa de 1,5 a 2,0 ng mL⁻¹ para os compostos analisados nas amostras de vinho (Tuzimski, 2012).

Outra importante ferramenta que vem sendo utilizada na análise de pesticidas em vinhos é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Fontana et al. (2011) avaliaram aplicabilidade da técnica de microextração de sorção acompanhada pela análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo (LC-TOF-MS) para a determinação de 15 pesticidas em amostras de vinho. Foram obtidos limites de quantificação que variaram entre 0,1 e 2,2 ng mL⁻¹, e recuperações relativas de 75% a 117%. Resíduos de pesticidas, tais como metalaxyl, fludioxonil, iprovalicarb e cyprodinil, foram encontrados nas amostras analisadas em concentrações acima de 10 ng mL⁻¹, sendo que os

valores encontrados para os pesticidas presentes nas amostras mostraram-se de acordo com aqueles obtidos por SPE, confirmando a boa exatidão do método proposto para análise de pesticidas em vinhos. Azoxystrobin, um pesticida em comum a este estudo, foi detectado em concentrações que variaram até 27,7 ng mL⁻¹.

Além das técnicas de preparo de amostras mencionadas anteriormente, a microextração com gota única (SDME) tem se mostrado apropriada e atrativa para a análise de traços de pesticidas em vinhos, devido à sua alta sensibilidade e simplicidade. Um trabalho publicado na literatura por Garbi et al. (2010), com essa finalidade, apresenta o desenvolvimento de um método usando SDME/GC-MS para a determinação dos pesticidas diazinon, dimethoate, chlorpyrifos, vinclozolin, fenthion e quinalphos em amostras de vinho. Após a otimização das condições experimentais para a microextração, foram obtidos limites de detecção variando entre 0,0030 e 0,0450 µg L⁻¹ e limites de quantificação na faixa de 0,01 a 0,15 µg L⁻¹. Apesar de não terem sido encontrados resíduos de pesticidas nas amostras analisadas, a combinação entre SDME e GC-MS mostrou-se adequada para a investigação de traços de pesticidas em vinhos.

Sendo o vinho uma das bebidas mais consumidas mundialmente e diante da possibilidade de transferência de resíduos de pesticidas das uvas para o produto final, torna-se de extrema relevância a identificação e quantificação destas substâncias na bebida, uma vez que já são conhecidos inúmeros malefícios que estes compostos podem acarretar à saúde humana quando ingeridos ou inalados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação dos padrões e reagentes

Os padrões certificados empregados para análise dos pesticidas foram carbofuran, molinate, sulfotep, demeton-O, dimethoate, diazinon, disulfoton, methyl parathion, fenitrothion, malathion, fenthion, dursban, parathion, endosulfan, ethion, bifenthrin, permethrin e azoxystrobin, todos adquiridos da AccuStandard.

O tolueno utilizado foi adquirido da Merck; metanol, cicloexano e isooctano (grau HPLC) foram obtidos da J.T. Baker. Também foi utilizado ácido clorídrico fumegante (Merck), ácido fosfórico (Merck), cloreto de sódio (99,6%) (J.T. Baker) e água ultrapura obtida de um sistema Barnstead.

Foram preparadas soluções-estoque com concentrações de 100 mg L⁻¹ (demeton-O, diazinon, disulfoton, ethion, malathion, methyl parathion e parathion), 500 mg L⁻¹ (bifenthrin, azoxystrobin, dursban e dimethoate), 600 mg L⁻¹ (carbofuran) e 1000 mg L⁻¹ (permethrin, molinate, sulfotep, fenitrothion e fenthion), solubilizados em metanol, com exceção de endosulfan (500 mg L⁻¹) que foi solubilizado em acetato de etila, mantidas sob refrigeração.

Além dos padrões e reagentes citados, foram utilizados equipamentos e materiais tais como placa de agitação (IKA; modelo C-MAG HS7), centrífuga (FANEM; modelo 205N), micropipetas 2-20, 20-200 e 100-1000 µL (Eppendorf), suporte universal, barra magnética para agitação e microseringa de 10 µL para cromatografia (Hamilton; modelo 701SNR).

3.2 Obtenção e preparação das amostras

3.2.1 Amostras de água de coco

Foram adquiridas amostras de água de coco industrializadas (provenientes de 3 marcas diferentes, dentre as quais foram avaliados 5 diferentes lotes) em estabelecimento comercial da cidade de Salvador-BA. Além destas, 5 amostras de água de coco natural foram analisadas, totalizando 20 amostras utilizadas na avaliação do método analítico desenvolvido.

As amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento das análises. Antes do procedimento de extração por SDME, alíquotas de 15 mL das amostras foram centrifugadas (3000 G) durante 5 minutos para eliminar materiais em suspensão, na bebida, já que prejudicavam a estabilidade da microgota na extremidade da agulha da seringa.

3.2.2 Amostras de vinho branco

Foram adquiridas 9 amostras de vinho branco, em estabelecimentos comerciais da cidade de Salvador-BA para a avaliação do método analítico desenvolvido. Até o momento das análises, as amostras foram armazenadas em local seco e arejado.

A Tabela 4 apresenta o tipo de vinho, a graduação alcoólica e a procedência das amostras utilizadas neste estudo.

TABELA 4 - Informações sobre as amostras de vinho branco analisadas

Amostra	Tipo	Graduação alcoólica (%)	Local de produção
1	vinho branco suave de mesa	9,5	Nacional (Rio Grande do Sul)
2	vinho fino branco seco	13	Importado (Argentina)
3	vinho branco de mesa seco	10,4	Nacional (Rio Grande do Sul)
4	vinho branco suave fino	12	Nacional (Pernambuco)
5	vinho branco seco fino	12	Nacional (Pernambuco)
6	vinho branco suave	13,5	Importado (Chile)
7	vinho branco de mesa seco	12,5	Importado (Argentina)
8	vinho branco de mesa fino seco	12,5	Importado (Chile)
9	vinho branco de mesa	10,5	Importado (Portugal)

Não foi necessário nenhum tratamento prévio das amostras de vinho branco para a realização da SDME, com exceção das amostras 8 e 9 que, por serem levemente frisantes, foram submetidas a banho ultrassônico por um período de 5 minutos para a remoção de bolhas que prejudicariam a estabilidade da microgota e, conseqüentemente, o procedimento de extração dos pesticidas.

3.3 Microextração com gota única (SDME)

Para a otimização das condições experimentais para SDME foram avaliadas as seguintes variáveis: solvente (tolueno, ciclohexano, isooctano), tempo de extração (10; 20; 30 e 40 min.), volume da microgota (0,5; 0,8 e 1,0 µL), volume da solução/amostra (1; 5 e 10 mL), velocidade de agitação (sem agitação; 100; 200 e 300 rpm); acidificação do meio (H₃PO₄ e HCl) e efeito “salting out” (sem sal e NaCl 10%), por meio de planejamento de experimentos univariado.

Para o procedimento de SDME, uma microsseringa de 10 μL (Hamilton) foi usada para medir e introduzir a microgota do solvente de extração (tolueno) no vial de vidro contendo a solução de extração ou amostra, barra magnética e septo de silicone.

Antes de cada extração, a seringa foi rinçada 6 vezes com metanol seguida de 3 vezes com tolueno.

O êmbolo foi então colocado na posição zero e 2 μL de tolueno foi puxado para dentro da seringa. Em seguida, a agulha da microsseringa foi inserida através do septo e imersa diretamente na solução de extração ou amostra (10 mL), sob agitação (200 G). O êmbolo da microsseringa foi deprimido até a posição de 1 μL (volume da gota) para expor a gota de tolueno e ocorrer a transferência dos analitos da fase aquosa para a gota orgânica.

Após o tempo de extração (30 min.), a gota foi puxada para dentro da microsseringa, removendo-se a agulha para fora do vial de vidro e imediatamente injetada em um sistema de cromatografia a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS) para posterior análise.

A Figura 9 apresenta um esquema com as etapas utilizadas no procedimento para SDME.

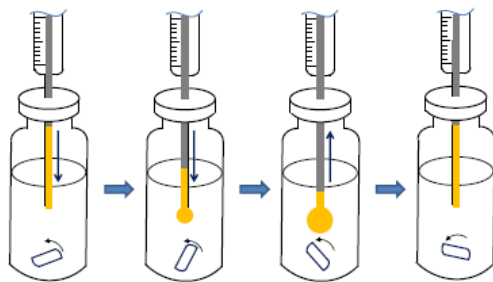


FIGURA 9 - Esquema das etapas utilizadas no procedimento para SDME

O mesmo procedimento para SDME foi aplicado para os padrões e para as amostras de água de coco e vinho branco, sendo realizados em triplicata.

3.4 Análises cromatográficas

As análises cromatográficas dos pesticidas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Química (LPQ), situado no Instituto de Química da UFBA.

As análises dos pesticidas foram feitas utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu (GCMS-2010 Plus), equipado com um injetor split/splitless operando no modo splitless a uma temperatura de 300°C durante a análise cromatográfica, com tempo de purga de 0,75 min.

As separações dos pesticidas foram realizadas empregando-se uma coluna capilar Restek Rtx[®]-1MS (30 m x 0,25 mm ID; 0,25 µm de espessura de filme), com fase estacionária composta por 100% dimetilpolisiloxano. Como gás de arraste foi utilizado hélio UP (pureza de 99,999%) sob um fluxo de 1,0 mL min⁻¹. A programação de temperatura do forno foi 60°C (1,0 min.); 200°C a 25°C min⁻¹; 280°C a 10°C min⁻¹; 300°C a 5°C min⁻¹ e finalizando a 300°C por 1,40 min., com tempo total de corrida de 20 min., de acordo com método adotado pelo Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Química – LPQ para a análise de pesticidas.

Para o detector de massas foram utilizadas as temperaturas da linha de transferência e fonte de íons a 300°C, e modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV.

A otimização dos tempos de retenção foi feita no modo SCAN, utilizando a faixa entre 40 e 500 m/z, utilizando uma solução padrão dos pesticidas em uma concentração de 10 mg L⁻¹.

A identificação e quantificação dos pesticidas em amostras reais de água de coco e vinho branco foram realizadas no modo de monitoramento do íon seletivo (SIM - Selected Ion Monitoring), sendo escolhidos dois íons específicos para cada analito, os quais um íon para a quantificação e o outro para confirmação do composto (Tabela 5), além da comparação do tempo de retenção das amostras em relação aos padrões. Para o pesticida permethrin, o qual apresenta estereoisomerismo, foram detectados dois picos, correspondendo aos isômeros cis e trans.

TABELA 5 - Parâmetros experimentais selecionados para análise dos pesticidas por GC-MS

Segmento (min.)	Analito	Íon de quantificação (m/z)	Íon de confirmação (m/z)	t_R (min.)
0,00 – 6,00	carbofuran	164	149	5,73
6,01 – 8,20	molinate	126	55	6,97
	sulfotep	322	97	7,66
	dimethoate	87	125	7,66
	demeton-O	88	60	7,94
8,21 – 8,70	diazinon	137	304	8,35
	disulfoton	88	60	8,45
	methyl parathion	109	125	8,45
8,71 – 10,00	fentirothion	109	125	8,97
	malathion	93	125	9,37
	fenthion	278	125	9,53
	dursban	97	197	9,59
	parathion	291	109	9,59
10,01 – 11,20	endosulfan	241	339	10,73
11,21 – 12,00	ethion	231	384	11,57
12,01 – 14,00	bifenthrin	181	105	13,02
14,01 – 15,50	permethrin I	183	163	14,55
	permethrin II	183	163	14,66
15,51 – 20,00	azoxystrobin	344	388	17,21

Na Figura 10 é mostrado o perfil cromatográfico da solução padrão de pesticidas na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, com a identificação dos respectivos picos dos compostos analisados.

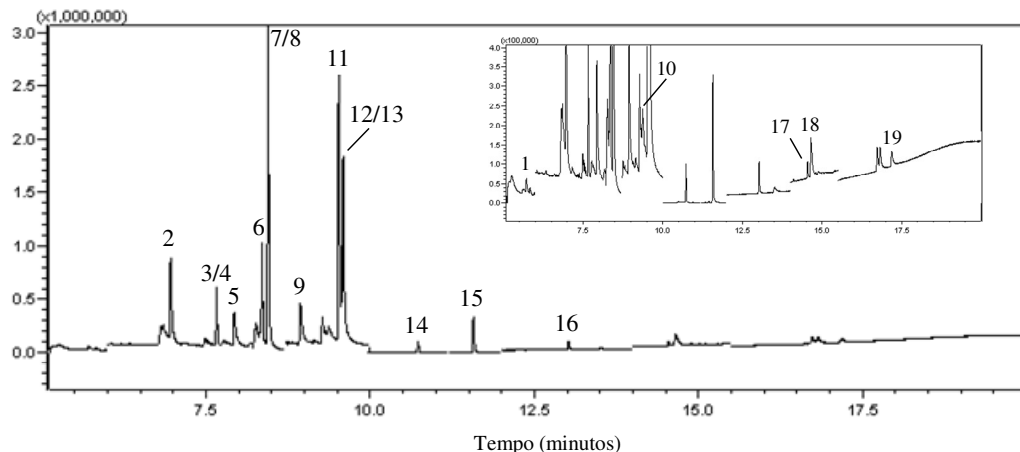


Figura 10 – Cromatograma obtido por GC-MS (modo TIC) da solução padrão de pesticidas ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) após otimização dos parâmetros de extração por SDME. Identificação dos picos: 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 – dimethoate; 5 - demeton-O; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 – azoxystrobin.

O método utilizado para a quantificação dos compostos foi o da padronização externa. Foi preparada uma solução intermediária, em metanol, contendo uma mistura de todos os padrões de pesticidas na mesma concentração ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) a partir das soluções-estoque previamente preparadas. Para a construção das curvas analíticas, foram realizadas diluições da solução intermediária, em água ultrapura. As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear, considerando o coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,9900.

3.4.1 Figuras de mérito

Para garantir a qualidade analítica dos resultados, foram realizados procedimentos para validação do método, sendo avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão.

A) Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de maneira inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa. Esse procedimento permite distinguir o analito de todo o resto que possa estar presente na amostra. A seletividade pode ser obtida de várias

maneiras: comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com essa substância (padrão); comparando o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão, por meio da utilização de detectores modernos; por meio do método de adição padrão; coletando o composto de interesse e realizando nova análise por outro método ou técnica que são específicos para a estrutura da substância de interesse (Ribani et al., 2004; Harris, 2008).

Para a avaliação da seletividade do método proposto, foi realizado o procedimento de comparação da matriz isenta das substâncias de interesse (pesticidas) e a matriz adicionada com os padrões dos analitos.

B) Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação.

A relação matemática entre o sinal e a concentração das espécies de interesse foi expressa por meio da equação da reta (curva analítica) e os respectivos coeficientes de determinação (R^2). Como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão, considera-se um coeficiente de correlação maior que 0,9900, apesar de que para alguns órgãos regulamentadores, tais como o INMETRO, são aceitos valores maiores ou iguais a 0,90 (INMETRO, 2003; Ribani et al., 2004; Azevêdo, 2007; Harris, 2008).

C) Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Pode ser avaliada por meio do desvio-padrão absoluto (σ) ou pela estimativa do desvio-padrão absoluto (s), quando o número de determinações é pequeno, pelo intervalo de confiança médio, ou mesmo pela estimativa do desvio-padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV).

Neste estudo, para estimativas da precisão do método, foram determinados os coeficientes de variação (CV) de uma série de medidas, por meio da utilização da seguinte equação matemática:

$$CV(\%) = \frac{s}{resp} \times 100$$

em que, s = estimativa do desvio-padrão; resp = resposta do equipamento de análise (área). Segundo Ribani et al.(2004), em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos CV de

até 20%, dependendo da complexidade da amostra, atestando, assim, a precisão do método analítico proposto.

A precisão, em validação de métodos, é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intraensaio ou intracorrída. Para a avaliação da repetitividade do método, foi realizada a análise de soluções-padrão, correspondentes a três níveis de concentração, submetidas a cinco diferentes preparações, sendo, então, estimado o CV correspondente para cada nível de concentração.

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório em razão de eventos, como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação desses fatores. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que, no mesmo laboratório, o método fornecerá os mesmos resultados. Pelo fato de utilizar apenas uma vez uma solução-padrão previamente preparada para o procedimento de SDME, já que se estima que parte dos analitos em solução tenham sido extraídos, este parâmetro não foi considerado no processo de validação do método.

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamento, etc.). Deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopeias, procedimentos do Codex, etc., e, por isso, não foi considerada neste estudo (Ribani et al., 2004; Azevêdo, 2007; Harris, 2008).

D) Limite de detecção

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental.

O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método da relação sinal-ruído e método baseado nos parâmetros da curva analítica.

Para a determinação do LD, foram considerados os parâmetros relativos a cada curva analítica construída, utilizando a seguinte relação matemática:

$$LD = 3 \times \frac{s}{S}$$

em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica (Ribani et al., 2004; Harris, 2008).

E) Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental.

Os mesmos critérios adotados para a determinação do LD podem ser adotados para o LQ, porém, utiliza-se a relação 10:1 (sinal:ruído).

Para a determinação do LQ, foram considerados os parâmetros relativos a cada curva analítica construída, utilizando a seguinte relação matemática:

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica (Ribani et al., 2004; Harris, 2008).

F) Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro, ou seja, define a “proximidade do valor verdadeiro”.

Os procedimentos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: comparação com materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão.

O número de ensaios varia de acordo com a legislação, diretriz adotada e, também, com as características da pesquisa; alguns órgãos estabelecem um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração (Ribani et al., 2004; Harris, 2008).

Com isso, a exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação utilizando uma das amostras de água de coco e uma de vinho branco, escolhidas aleatoriamente, sendo essas fortificadas com padrões dos analitos em 3 níveis de concentrações diferentes. A recuperação foi determinada considerando os resultados obtidos para cada analito estudado, utilizando a seguinte equação matemática:

$$\% \text{Recuperação} = \frac{\text{concentração medida}}{\text{concentração esperada}} \times 100$$

Os valores aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$; porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, esse valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (Ribani et al., 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização das condições experimentais para SDME

Em trabalhos anteriores (Pinheiro & De Andrade, 2009; Pinheiro et al., 2011), foi aplicado delineamento experimental multivariado para a otimização das condições experimentais para SDME na análise de pesticidas organofosforados e piretróides em água avaliando, entre outras, as seguintes variáveis: solvente, tempo de extração e volume da gota. Com base nos resultados obtidos anteriormente, foi possível usar delineamento univariado, neste estudo, para avaliar: solvente (tolueno, cicloexano, isooctano), tempo de extração (10; 20; 30 e 40 min.) e volume da gota (0,5; 0,8 e 1,0 μL).

A escolha de um solvente adequado é muito importante para a obtenção de uma boa seletividade e uma melhor eficiência de extração dos analitos utilizando SDME. Assim, o solvente escolhido deve apresentar baixa solubilidade em água, baixa toxicidade, boa estabilidade da gota formada e, acima de tudo, ser capaz de extrair eficazmente os analitos (Kin & Huat, 2009).

Na Figura 11, pode-se observar que todos os solventes estudados apresentaram boa eficiência na extração dos pesticidas. Assim, o tolueno foi selecionado devido à sua melhor compatibilidade com a análise de pesticidas por cromatografia a gás.

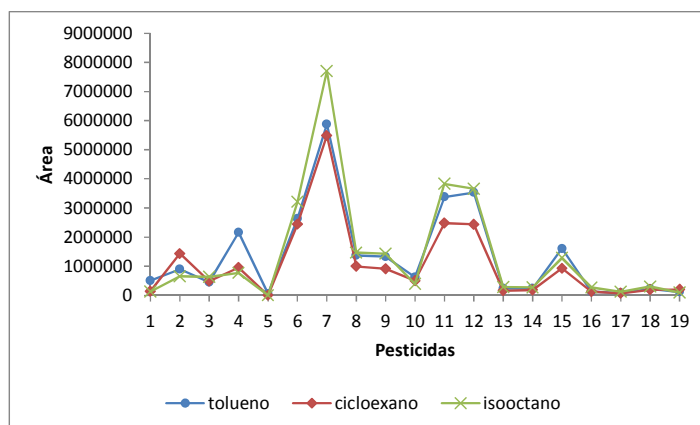


FIGURA 11 - Áreas obtidas para a otimização do solvente (tempo de extração: 30 min.; volume da gota: 1,0 μL). Solução padrão ($50 \mu\text{g L}^{-1}$): 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 - demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 - azoxystrobin.

Normalmente, quando se utiliza SDME, a eficiência de extração aumenta com o tempo. Por outro lado, o tempo selecionado deve ser suficiente para permitir que a microgota extraia adequadamente os analitos alvo, não devendo ser muito longo para evitar a dissolução da microgota (Kin & Huat, 2009). Na Figura 12, pode ser observado que os resultados sugerem que o equilíbrio da extração foi alcançado próximo a 30 min.. Após este tempo, foi observada a dissolução de parte da microgota, dificultando o controle do tamanho da mesma. Assim, o tempo de extração escolhido foi de 30 min..

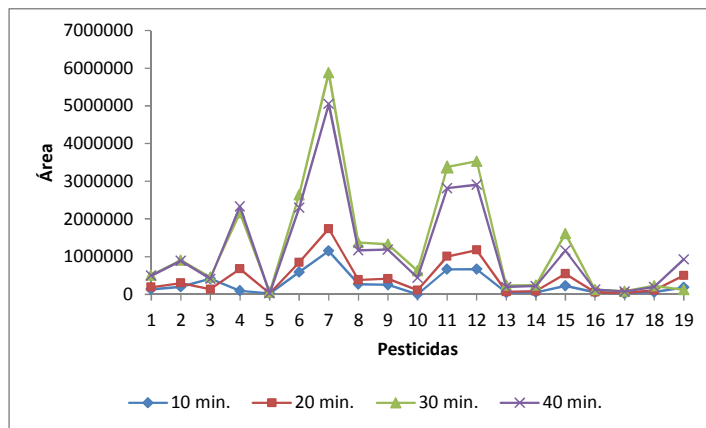


FIGURA 12 - Áreas obtidas para a otimização do tempo de extração (solvente: tolueno; volume da gota: 1,0 μL). Solução padrão ($50 \mu\text{g L}^{-1}$): 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 - demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 - azoxystrobin.

Em geral, o uso de um maior volume da gota resulta em um aumento da resposta do instrumento analítico. No entanto, gotas muito volumosas podem ser de difícil manipulação e menos confiáveis. Além disso, pode haver um comprometimento no processo de difusão dos analitos pelo aumento do volume da gota, havendo necessidade de um tempo maior para alcançar o equilíbrio (Kin & Huat 2009). Portanto, o volume da microgota escolhido foi de 1,0 μL por ter apresentado boa estabilidade da gota, bem como uma melhor eficiência de extração dos pesticidas, de modo a assegurar boa reprodutibilidade e permitir a utilização de agitação rápida (Figura 13).

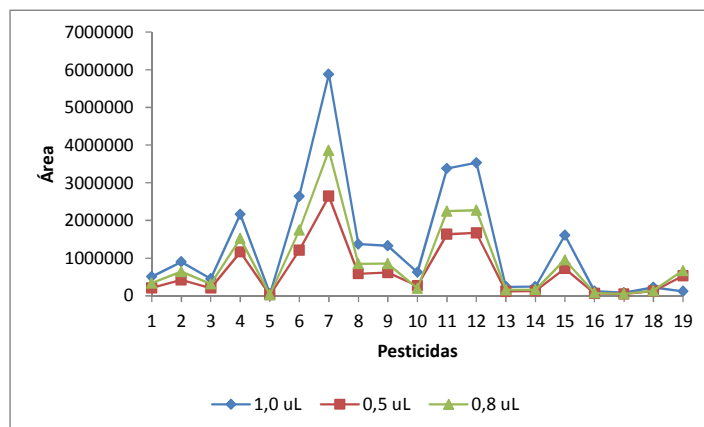


FIGURA 13 - Áreas obtidas para a otimização do volume da gota (solvente: tolueno; tempo de extração: 30 min.). Solução padrão ($50 \mu\text{g L}^{-1}$): 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 - demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 - azoxystrobin.

Foram realizados testes adicionais, a fim de obter uma melhor resposta para cada pesticida analisado. Deste modo, avaliou-se também o volume da solução (1, 5 e 10 mL), a velocidade de agitação (sem agitação, 100, 200 e 300 rpm), a acidificação do meio de extração (sem adição de ácido, com H_3PO_4 e com HCl) e o efeito *salting-out* (sem adição de sal e com 10% de NaCl).

Para os testes realizados com diferentes volumes de solução, embora as áreas obtidas fossem muito próximas para os volumes de 5 e 10 mL (Figura 14), foi escolhido o volume de 10 mL de solução uma vez que, com este, conseguiu-se um melhor controle e estabilidade da gota na extremidade da agulha da microseringa quando foi realizada agitação com uma barra magnética submersa na solução.

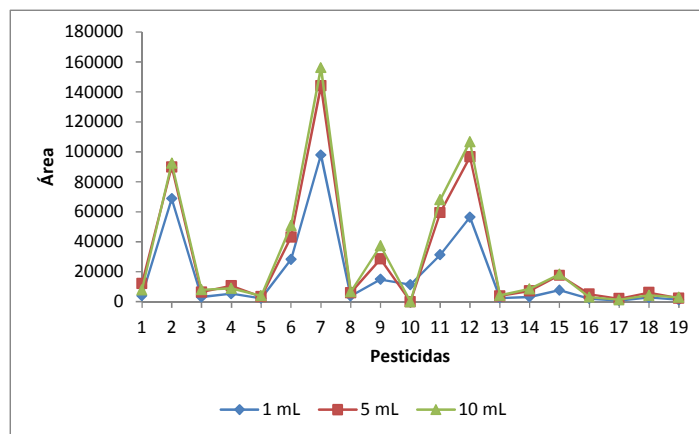


FIGURA 14 - Áreas obtidas para a otimização do volume de solução. Solução padrão ($25 \mu\text{g L}^{-1}$): 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 - demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 - azoxystrobin.

Observou-se também que a agitação foi um fator que determinou um aumento significativo na área dos picos dos pesticidas analisados. A melhor eficiência de extração é obtida quando se utiliza agitação rápida devido ao fato de que a agitação permite uma exposição contínua entre a superfície de extração e a amostra (Kin & Huat, 2009). Foi possível observar uma melhor extração dos pesticidas para as velocidades de 200 e 300 rpm (Figura 15). No entanto, foi escolhida a velocidade de 200 rpm uma vez que, nesta velocidade, poderia ocorrer uma menor perturbação da solução, quando comparada a 300 rpm, e, conseqüentemente, uma maior estabilidade da microgota na ponta da agulha da microseringa. Para velocidades maiores que 300 rpm, verificou-se que havia desprendimento da gota com muita facilidade, impedindo o recolhimento da mesma para que fosse posteriormente injetada no sistema cromatográfico.

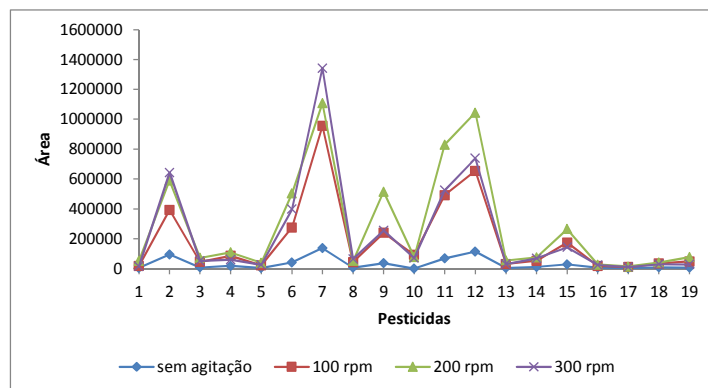


FIGURA 15 - Áreas obtidas para a otimização da velocidade de agitação. Solução padrão ($25 \mu\text{g L}^{-1}$): 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 - demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 - azoxystrobin.

Ito et al . (1988) sugerem que as moléculas de certos pesticidas são muitas vezes mais estáveis em meio aquoso ácido, quando comparado a um meio básico, como no caso do fenitrothion. Deste modo, o efeito da acidificação do meio na eficiência de extração dos pesticidas foi estudado utilizando dois ácidos não oxidantes: ácido clorídrico e ácido fosfórico.

A Figura 16 mostra que, utilizando ambos os ácidos, foi obtida uma correlação linear positiva significativa entre os dados obtidos para a extração sem o uso de ácido e acidificando o meio de extração . Coeficientes de correlação (R) de 0,9924 foram obtidos para a utilização de ácido clorídrico e 0,9593 para o uso de ácido fosfórico, revelando que a acidificação do meio é um fator importante para a extração de pesticidas utilizando SDME. Além disso, observou-se que a inclinação da reta obtida para a correlação utilizando o ácido clorídrico (1,6023) foi mais elevada, em comparação com a obtida por meio da utilização de ácido fosfórico (0,8216), demonstrando um aumento mais acentuado da eficiência da extração quando foi utilizado ácido clorídrico. Neste contexto, a acidificação do meio foi adotada para a extração dos pesticidas, e o ácido clorídrico foi escolhido devido à sua melhor resposta à análise dos analitos, após o processo de extração, especialmente para pesticidas organofosforados tais como disulfoton, fenitrothion, fenthion e dursban.

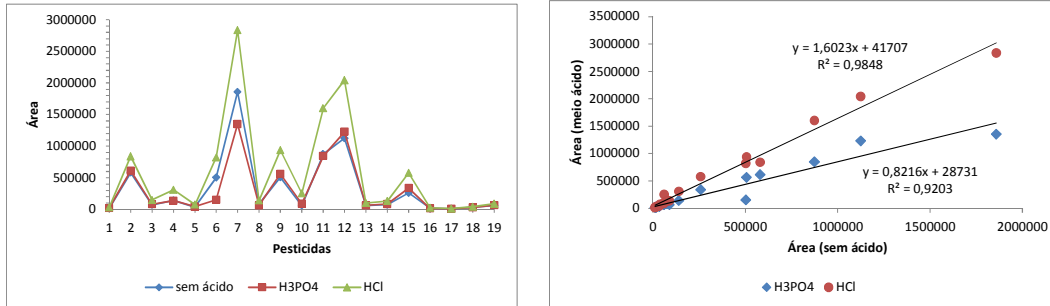


FIGURA 16 – Correlação entre as respostas obtidas para a extração dos pesticidas sem utilização de ácido e acidificando o meio com ácido fosfórico e ácido clorídrico, respectivamente. Solução padrão ($25 \mu\text{g L}^{-1}$): 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 - demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 – azoxystrobin.

O efeito *salting-out* está relacionado com a interação entre a água e o sal, reduzindo assim a solvatação de moléculas em solução aquosa (Leschev & Zayats, 2012). Neste sentido, sais como o cloreto de sódio melhoram a estruturação da fase aquosa e, conseqüentemente a energia de coesão da água devido às suas fortes interações com os dipolos da mesma, promovendo uma mudança no equilíbrio de partição de solutos orgânicos neutros em direção a fases não aquosas, facilitando a extração de analitos contidos em fases aquosas (Endo et al., 2012). Por outro lado, Kin e Huat (2009) mostraram que a adição de sal provocou uma ligeira redução da eficiência de extração para a maioria dos pesticidas estudados, sendo mais pronunciada para os compostos menos polares. No entanto, no presente estudo, não foi observada nenhuma influência significativa para a extração de pesticidas quando o sal foi adicionado à solução padrão, uma vez que as áreas entre as soluções obtidas com e sem a adição de sal foram muito próximas (Figura 17). Assim, optou-se por não adicionar sal à solução para a extração de pesticidas.

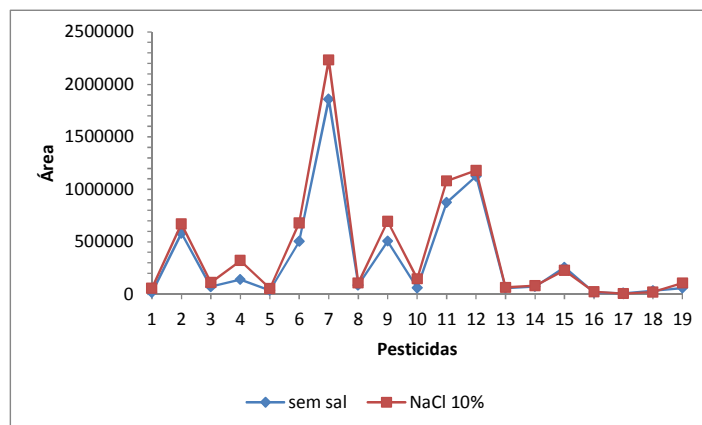


FIGURA 17 – Efeito *salting-out* na eficiência de extração de pesticidas por SDME. Solução padrão ($25 \mu\text{g L}^{-1}$): 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 – demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 – azoxystrobin.

Após a execução dos experimentos, constatou-se que os melhores parâmetros obtidos para a análise dos pesticidas utilizando o método de extração proposto foram: solvente (tolueno); tempo de extração (30 min.); volume da gota ($1,0 \mu\text{L}$); volume da solução (10 mL); velocidade de agitação (200 rpm); com acidificação do meio com HCl e sem adição de sal, já que possibilitou melhor extração dos analitos do meio aquoso.

4.1.1 Influência da graduação alcoólica do vinho na extração dos pesticidas por SDME

Para avaliar a influência da graduação alcoólica na eficiência de extração dos pesticidas, procedeu-se com a técnica de SDME utilizando soluções padrão de pesticidas preparadas em soluções aquosa e alcoólica com concentrações de etanol variando de 0% a 40% (v/v), conforme mostrado na Figura 18.

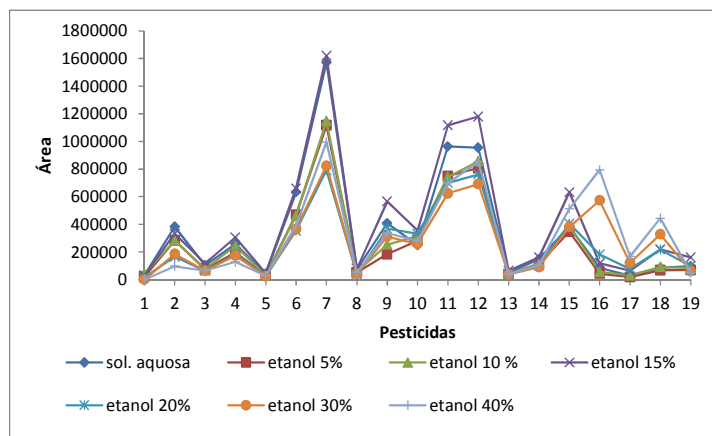


FIGURA 18 - Influência da graduação alcoólica na extração dos pesticidas, usando SDME, em solução padrão ($10 \mu\text{g L}^{-1}$). Pesticidas: 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 - demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 - azoxystrobin.

Por meio dos resultados obtidos para a eficiência de extração dos pesticidas, verificou-se que até 15% de álcool etílico não houve diferença significativa na extração dos analitos, observado pela correlação entre os resultados referentes a solução padrão aquosa (0% de etanol) e a solução padrão alcoólica com concentração de 15% de etanol, sendo obtido um coeficiente de correlação (R) de 0,9860 e inclinação da reta de correlação muito próxima a unidade (1,071) (Figura 19).

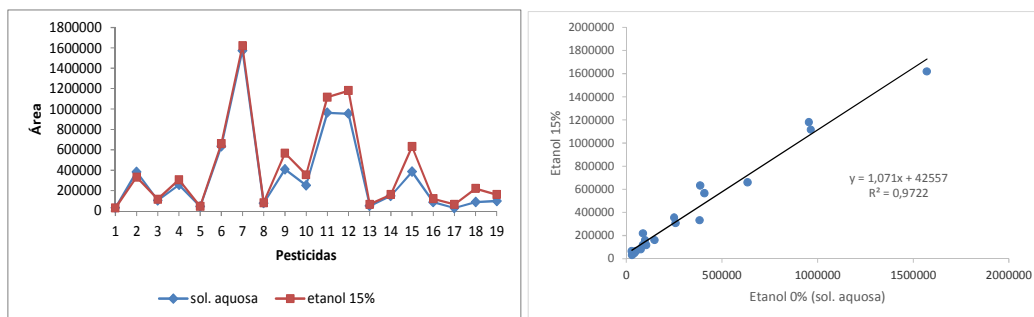


FIGURA 19 - Correlação entre as respostas obtidas para a eficiência de extração dos pesticidas em solução padrão aquosa (etanol 0%) e em solução padrão alcoólica (etanol 15%). Pesticidas: 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 – demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 – azoxystrobin.

Desta maneira, não houve necessidade de preparação e otimização do procedimento de extração utilizando soluções padrão alcoólicas para simular a matriz alcoólica a ser estudada (vinho branco) visto que a graduação alcoólica das amostras analisadas variou de 9,5% a 13,5%. Assim, o método de extração proposto mostrou-se eficiente para a extração de pesticidas tanto de soluções aquosas quanto de soluções alcoólicas com uma concentração de etanol de até 15%. Acima de 15% de etanol foi constatada uma redução significativa na eficiência de extração da maioria dos pesticidas, devendo-se realizar todos os testes de otimização e validação do método analítico em soluções padrão de pesticidas preparadas em etanol, de acordo com a graduação alcoólica da bebida a que o método será aplicado. Além disso, para a solução alcoólica de 40% de etanol, verificou-se uma significativa perda da microgota durante o procedimento de extração havendo solubilização de parte do solvente de extração e, conseqüentemente, diminuição do tamanho e volume da gota.

Diante disso, o método mostrou-se robusto e abrangente para ser aplicado a diferentes tipos de matrizes, tais como água de coco e vinho branco.

4.2 Validação do método analítico

Os parâmetros avaliados na validação do método proposto foram seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação.

Nas condições cromatográficas empregadas, constatou-se que as amostras não apresentaram substâncias interferentes nos tempos de retenção dos pesticidas analisados, os

quais podem ser observados por meio do cromatograma de uma amostra de água de coco e de vinho branco, respectivamente, isentas da adição dos compostos analisados e dessas mesmas amostras fortificadas com os padrões dos analitos, numa concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada composto (Figura 20 e Figura 21), atestando, assim, a seletividade do método analítico.

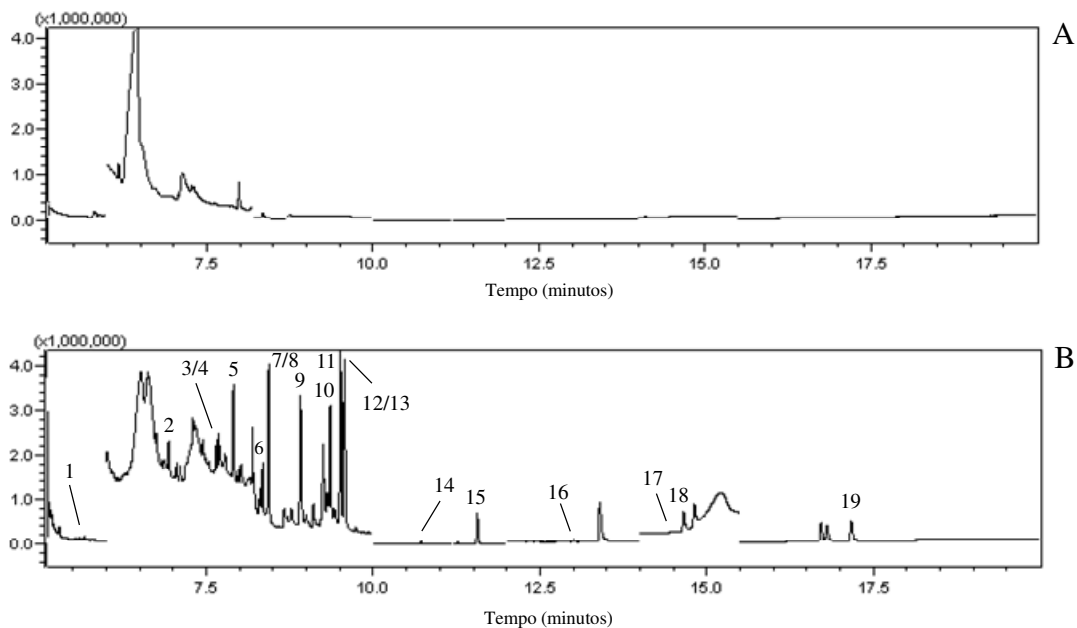


FIGURA 20 – Cromatogramas obtidos por GC-MS (modo TIC) de uma das amostras de água de coco (A) e da mesma amostra adicionando-se os padrões de pesticidas numa concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (B), para a certificação da seletividade. Identificação dos picos: 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 - demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 - azoxystrobin.

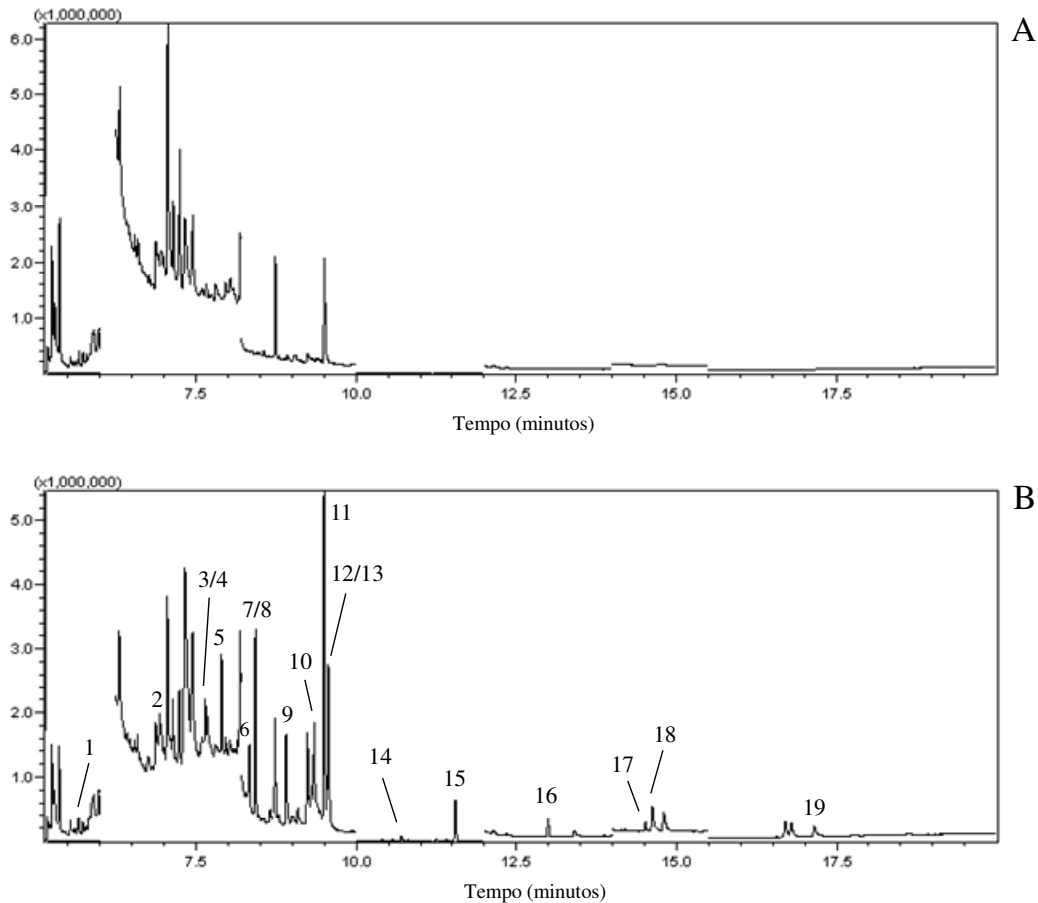


FIGURA 21 – Cromatogramas obtido por GC-MS (modo TIC) de uma das amostras de vinho branco (A) e da mesma amostra adicionando-se os padrões de pesticidas numa concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (B), para a certificação da seletividade. Identificação dos picos: 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 – demeton-O; 5 - dimethoate; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 – azoxystrobin.

Por meio da construção das curvas analíticas, foi possível avaliar a linearidade do método pela estimativa dos coeficientes de determinação referentes às equações das curvas, obtidas por regressão linear. Foram obtidos coeficientes de determinação variando de 0,9254 a 0,9997, mostrando a alta correlação linear entre a concentração dos compostos analisados e as áreas dos picos, com valores acima de 0,90 para o coeficiente de correlação, conforme recomendado por alguns órgãos de regulamentação de métodos analíticos tais como o INMETRO (INMETRO, 2003) (Tabela 6).

TABELA 6 – Parâmetros das curvas analíticas e os respectivos coeficientes de determinação (R^2)*

Pesticidas	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	b	a	R^2
carbofuran	1,0 - 25,0	9495,488	-17203,36	0,9911
molate	0,5 - 15,0	149495,7	-37147,36	0,9997
sulfotep	0,5 - 15,0	24707,92	-17114,490	0,9922
dimethoate	0,25 - 15,0	10282,4171	-5679,89441	0,9927
demeton-O	0,5 - 15,0	71243,12	-55097,82	0,9955
diazinon	0,5 - 15,0	112633,1	-74160,0	0,9957
disulfoton	0,5 - 15,0	376080,1	-165021,800	0,9974
methyl parathion	0,5-15,0	18324,43434	-11290,536	0,9914
fenitrothion	0,5 - 15,0	130447,7	-117456,9	0,9922
malathion	1,0 - 25,0	53134,83	-154773,5	0,9254
fenthion	0,5 - 15,0	178161,3	-121100,2	0,9951
dursban	0,5 - 15,0	192285,1	-85342,62	0,9968
parathion	0,5 - 15,0	11997,34522	-7902,1749	0,9913
endosulfan	0,25 - 10,0	14177,61	-2007,778	0,9984
ethion	0,5 - 15,0	72700,97	-30318,930	0,9996
bifenthrin	0,5 - 25,0	10591,150	8873,822	0,9885
permethrin I	0,5 - 15,0	7653,241	1342,283	0,9916
permethrin II	0,5 - 25,0	24753,270	-8820,058	0,9981
azoxystrobin	0,5 - 15,0	24983,1	-13274,01	0,9925

*Regressão linear: $y = bx + a$

A precisão do método analítico foi avaliada em relação aos níveis de repetitividade, estimando o coeficiente de variação (CV) para cada composto analisado a partir de sucessivas medições. Foram avaliadas as áreas dos picos obtidos a partir da injeção de soluções padrão dos pesticidas em 3 níveis de concentração (1; 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$). Entretanto, para os compostos dimethoate e endosulfan foi avaliada também a concentração de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, já que esta foi a menor concentração relativa às respectivas curvas analíticas.

Pelos resultados obtidos mediante os testes, obtiveram-se os CV, que variaram de 10,3% (dimethoate) a 14,5% (endosulfan), na concentração de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, de 3,09% (disulfoton) a 16,3% (demeton-O), na concentração de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, de 8,28% (endosulfan) a 25,0% (carbofuran), na concentração de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, e de 4,99% (disulfoton) a 21,4% (azoxystrobin), na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 7).

TABELA 7 - Médias das áreas dos picos (n = 5) e coeficientes de variação (CV) obtidos para cada pesticida na avaliação da precisão do método

Composto	0,5 µg L ⁻¹		1 µg L ⁻¹		5 µg L ⁻¹		10 µg L ⁻¹	
	Área	CV (%)	Área	CV (%)	Área	CV (%)	Área	CV (%)
carbofuran	-	-	-	-	4340,0	25,0	14975,6	13,3
molinate	-	-	31566,6	11,3	196889,2	12,6	378529,0	6,10
sulfotep	-	-	8016,2	7,95	43669,6	16,7	76874,0	14,5
dimethoate	833,0	10,3	3311,3	4,32	24165,2	9,61	35506,6	7,11
demeton-O	-	-	15714,6	16,3	122354,5	12,3	211692,8	14,5
diazinon	-	-	36523,8	10,5	207875,6	18,2	324939,2	13,2
disulfoton	-	-	99546,5	3,09	817022,3	37,9	1179516,8	4,99
methyl parathion	-	-	3765,3	5,89	32950,8	19,1	52343,8	8,68
fenitrothion	-	-	-	-	104945,0	21,1	384215,0	10,4
malathion	-	-	23396,8	15,6	35880,75	13,6	91883,4	18,5
fenthion	-	-	65840,5	9,91	244304,2	13,5	724325,8	12,2
dursban	-	-	61876,7	9,70	257517,2	9,56	737409,2	11,4
parathion	-	-	3193,2	9,87	13300,2	17,2	38411,4	8,63
endosulfan	1261,6	14,5	6586,7	7,46	25121,4	8,28	69107,6	10,1
ethion	-	-	31874,5	7,71	90983,6	14,6	292495,2	15,4
bifenthrin	-	-	10324,3	7,16	23774,7	17,9	47672,6	7,53
permethrin I	-	-	3476,3	6,78	8942,8	16,9	21943,8	12,5
permethrin II	-	-	8677,0	3,95	23752,5	19,3	62438,8	14,0
azoxystrobin	-	-	8775,8	12,3	16148,4	19,9	39810,2	21,4

O método apresentou precisão satisfatória para a maioria dos pesticidas analisados em água de coco e vinho branco, sendo obtidos CV abaixo de 20% conforme recomendado por Ribani et al. (2004), considerando a complexidade do tipo de extração dos analitos empregada neste trabalho e as baixas concentrações dos pesticidas analisados. Para os compostos carbofuran e fenitrothion não foram obtidos valores de repetitividade consideráveis para os menores níveis de concentração e, por isso, não foram apresentados.

Os limites de detecção e quantificação obtidos para o método analítico estão apresentados na Tabela 8.

TABELA 8 – Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os pesticidas analisados

Pesticidas	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
carbofuran	0,88	2,94
molinate	0,38	1,28
sulfotep	0,10	2,51
dimethoate	0,25	6,11
demeton-O	0,25	3,26
diazinon	0,10	2,53
disulfoton	0,10	2,37
methyl parathion	0,50	6,65
fenitrothion	0,50	3,47
malathion	0,73	2,42
fenthion	0,10	2,96
dursban	0,25	2,48
parathion	0,25	6,69
endosulfan	0,10	1,99
ethion	0,10	2,73
bifenthrin	0,36	1,21
permethrin I	0,25	1,81
permethrin II	0,10	2,42
azoxystrobin	0,25	2,67

Pode-se observar que os limites de detecção e quantificação encontrados para os pesticidas variaram de 0,1 a 0,88 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1,21 a 6,69 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os valores obtidos apresentaram-se abaixo àqueles encontrados por Santos et al. (2012), para a análise de pesticidas em água de coco e ligeiramente acima àqueles obtidos por Garbi et al. (2010) para a análise em vinhos, o que demonstra a boa sensibilidade do método para a análise resíduos de pesticidas nas respectivas matrizes. Diferenças nesses parâmetros podem ser provenientes de alterações nas condições cromatográficas empregadas, como na aparelhagem e/ou métodos de preparo de amostras adotados para a quantificação dos compostos (Ribani et al., 2004).

A exatidão do método analítico foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, em que a concentração dos pesticidas foi calculada pelo aumento das áreas dos picos, obtida após a adição de uma quantidade conhecida dos padrões a amostras de água de coco (Tabela 9) e vinho branco (Tabela 10) escolhidas aleatoriamente.

TABELA 9 - Recuperação dos pesticidas em amostra de água de coco^a

Pesticidas	Concentração na amostra ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% Recuperação			
		Concentração adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
		0,5	1	5	10
carbofuran	ND		NQ	110	99,3
molate	ND		37,1	78,2	72,6
sulfotep	ND		133	90,5	104
dimethoate	ND	160		93,4	106
demeton-O	<LD		80,0	117	92,2
diazinon	ND		142	119	102
disulfoton	<LQ		55,3	75,7	83,2
methyl parathion	ND		114	128	102
fenitrothion	5,51		72,6	133	110
malathion	3,57		95,4	86,4	95,9
fenthion	ND		121	89,2	102
dursban	ND		110	55,9	77,4
parathion	ND		118	82,6	84,2
endosulfan	ND	28,3		28,3	30,4

Continua...

Tabela 9, continuação

ethion	ND	88,3	52,7	57,0
bifenthrin	ND	NQ	65,6	82,1
permethrin I	ND	27,9	40,7	49,6
permethrin II	ND	54,0	40,5	40,6
azoxystrobin	ND	160	143	100

^a ND = não detectado; NQ = não quantificado; <LD = menor que o limite de detecção; <LQ = menor que o limite de quantificação.

Para os resultados apresentados em água de coco, foram obtidos baixos valores de recuperação para alguns compostos tais como permethrin I e permethrin II (variando de 27,9% a 54,0%), já que são compostos que apresentam coeficientes de partição relativamente baixos (Tabela 9), devendo apresentar assim maior afinidade pela fase aquosa. Com isso, pode-se constatar uma maior dificuldade da migração destes analitos da fase aquosa (amostra) para a fase orgânica (gota).

Para o composto endosulfan, apesar de apresentar um coeficiente de partição relativamente alto, comparado aos demais analitos, observou-se uma anormalidade no comportamento deste durante o processo de extração já que foi obtido um valor baixo de recuperação média (29,0%), devendo-se este apresentar uma maior afinidade pela fase orgânica e, conseqüentemente, melhor extração. Possivelmente, a dificuldade de extração deste composto esteja relacionada à sua interação com outras substâncias presentes na água de coco. Este fato pode ser explicado pela maior polaridade das moléculas dos compostos organoclorados comparadas a outras classes de compostos, tais como os organofosforados, o que promove uma maior afinidade por fases aquosas do que em fases orgânicas, dificultando, assim, a extração de substâncias desta natureza.

TABELA 10 - Recuperação dos pesticidas em amostra de vinho branco^a

Pesticidas	Concentração na amostra ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% Recuperação			
		Concentração adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
		0,5	1	5	10
carbofuran	9,67		81,1	75,0	94,9
molinate	ND		130	56,9	76,6
sulfotep	ND		114	79,7	86,8
dimethoate	ND	NQ		103	99,0
demeton-O	ND		171	132	112
diazinon	ND		125	91,5	89,3
disulfoton	ND		83,8	67,8	74,5
methyl parathion	ND		168	100	99,1
fenitrothion	ND		142	109	101
malathion	ND		NQ	161	124
fenthion	ND		119	86,2	88,5
dursban	8,79		13,2	34,1	52,4
parathion	ND		120	100	112
endosulfan	ND	84,9		58,4	66,2
ethion	ND		120	103	105
bifenthrin	ND		144	176	191
permethrin I	ND		152	114	145
permethrin II	ND		161	104	136
azoxystrobin	<LQ		99,2	104	98,6

^a ND = não detectado; NQ = não quantificado; <LQ = menor que o limite de quantificação.

Para o vinho branco, vale ressaltar que foi observada baixa recuperação para o pesticida dursban, cujos valores variaram de 13,2% a 52,4% (Tabela 10). Possivelmente, a dificuldade de extração deste composto esteja relacionada à sua interação com outras substâncias presentes no vinho branco.

Pode-se constatar que os valores de recuperação obtidos em vinho branco apresentaram-se mais próximos dos limites aceitáveis quando comparados àqueles encontrados em água de coco. Entretanto, de maneira geral, o método apresentou boa recuperação para a determinação de pesticidas em água de coco e vinho branco cujos valores médios se incluíam nos limites

considerados aceitáveis (entre 50% e 120%, devido à complexidade da extração dos analitos utilizando a SDME como técnica de extração/pré-concentração e o número de compostos analisados).

4.3 Aplicação do método analítico em amostras reais

4.3.1 Água de coco

A Figura 22 mostra o perfil cromatográfico obtido para uma das amostras de água de coco analisadas.

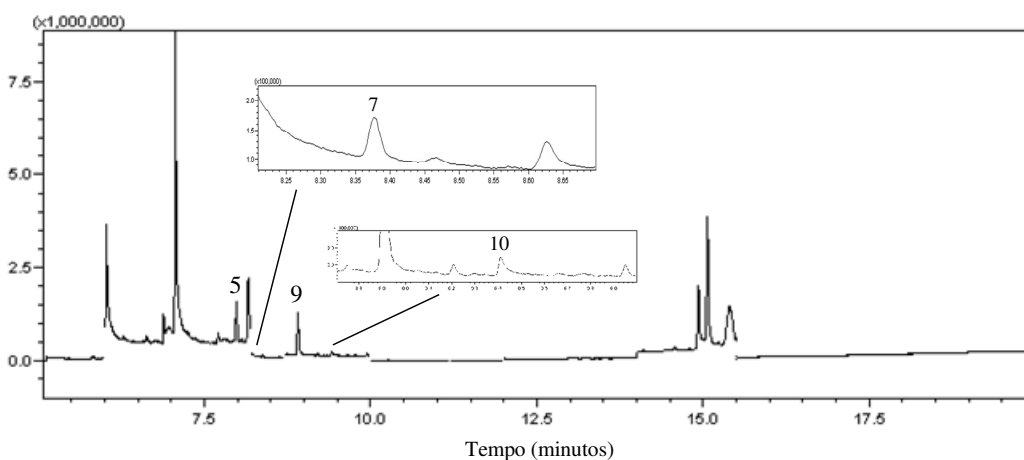


FIGURA 22 – Cromatograma obtido por GC-MS (modo TIC) de uma das amostras de água de coco industrializada. Identificação dos picos: 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 - dimethoate; 5 - demeton-O; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 - azoxystrobin.

Os resultados obtidos para a quantificação dos 19 pesticidas em amostras reais de água de coco estão apresentados na Tabela 11.

TABELA 11 - Concentração dos pesticidas ($\mu\text{g L}^{-1}$) encontrados nas amostras de água de coco

Pesticidas	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^a																			
	Água de coco industrializada															Água de coco natural				
	Marca 1					Marca 2					Marca 3									
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	1	2	3	4	5
carbofuran	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
molinatate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
sulfotep	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<LQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
dimethoate	<LQ	ND	ND	12,1±7,48	ND	ND	<LQ	ND	ND	ND	ND	<LQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
demeton-O	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	ND	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	ND	<LQ	ND	ND	ND	ND	ND
diazinon	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
disulfoton	ND	ND	ND	ND	<LQ	ND	<LQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
methyl parathion	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
fenitrothion	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	5,51±1,37	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	ND	<LQ	ND	ND	<LQ	<LQ	<LQ
malathion	3,41±0,27	4,23±0,82	3,28±0,06	3,70±0,58	3,57±0,70	ND	3,31±0,18	3,52±0,90	ND	ND	5,57±2,43	5,11±0,24	3,65±0,80	ND	ND	ND	ND	3,14±0,13	ND	3,33±0,30
fenthion	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
dursban	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
parathion	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
endosulfan	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ethion	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
bifenthrin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
permethrin I	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
permethrin II	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
azoxystrobin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^a Média ± desvio padrão (n = 3); ND = não detectado; <LQ = menor que o limite de quantificação.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível constatar que os pesticidas encontrados nas amostras de água de coco foram sulfotep, demeton-O, dimethoate, disulfoton, fenitrothion e malathion. Entre os analitos presentes nas amostras analisadas, foram observadas concentrações que variaram de <LQ a $12,1 \mu\text{g L}^{-1}$ (dimethoate). Vale ressaltar que, entre os compostos encontrados, os inseticidas e acaricidas comumente usados para controlar a ação de pragas nas culturas de coqueiros são dimethoate e malathion (Embrapa, 2002), os quais apresentaram as maiores concentrações nas amostras de água de coco, especialmente nas amostras de origem industrial.

Estudos realizados por Deme et al. (2012) utilizando extração em fase sólida (SPE) seguido pela análise por LC-MS/MS mostraram que, dentre os pesticidas analisados em água de coco, apenas malathion foi encontrado em 23% das amostras, em concentrações variando de 24 a 45 ng L^{-1} . Os autores comentam que a detecção deste analito nas amostras foi possível apenas após a execução de diferentes etapas de pré-concentração das amostras. Neste sentido, o método proposto neste estudo apresenta como vantagem maior simplicidade e a execução de apenas uma etapa para extração e pré-concentração das amostras.

Outros trabalhos reportados na literatura utilizando diferentes métodos instrumentais e técnicas de extração/pré-concentração foram aplicados na análise de pesticidas em água de coco. Técnicas como a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) seguida pela análise por cromatografia líquida com detecção ultravioleta ou cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas não detectaram resíduos de pesticidas em amostras de água de coco, possivelmente por não terem atingido níveis de detecção compatíveis para este tipo de análise (Silva et al., 2008; Santos et al., 2012).

Pelo fato de não haver uma legislação específica para a presença de pesticidas em água de coco comparou-se os resultados obtidos neste estudo com os padrões de potabilidade da água para substâncias químicas que representam risco à saúde. A legislação brasileira estabelece limites máximos para dois pesticidas utilizados neste trabalho, endosulfan ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) e permethrin ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) (Brasil, 2006). A legislação internacional estabelece um limite máximo permitido de 40 mg L^{-1} para o pesticida carbofuran em água potável (EPA, 2013). Assim, os resultados obtidos para estes pesticidas em água de coco apresentaram-se abaixo dos limites estabelecidos em relação à legislação brasileira e internacional para água potável, já que estes não foram detectados nas amostras analisadas.

Com o intuito de verificar se houve diferença significativa entre as amostras de água de coco industrial e natural, realizou-se a análise por componentes principais (PCA) com as concentrações médias dos pesticidas para as amostras analisadas, apesar do número reduzido de

amostras para este tipo de avaliação estatística. O modelo ajustado apresentou dois fatores que representam 83,2% da variância no conjunto de dados iniciais. O fator 1 representa 50,4% da variância no conjunto de dados iniciais e possui pesos elevados para demeton-O (-0,81) e malathion (-0,82). Esses analitos provocaram uma separação entre as amostras de origem natural e industrial de água de coco (Figura 23), apresentando-se em maiores concentrações para as amostras de origem industrial. O fator 2 apresentou pesos elevados para o dimethoate (0,67), apesar de não ter provocado separações efetivas nos grupos de amostras. Pelo fato das respostas obtidas terem sido explicadas pelos fatores 1 e 2, não houve a necessidade de avaliar a influência de outros fatores na comparação dos dados obtidos.

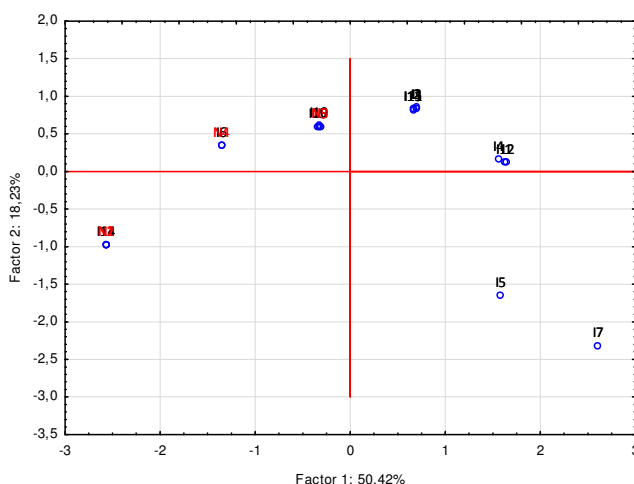


FIGURA 23 – Gráfico de PCA loadings para as concentrações de pesticidas em amostras de água de coco industrial e artesanal; I = amostras de água de coco industrial e N = amostras de água de coco natural

A diferença entre amostras de água de coco naturais e industriais ficou mais aparente por meio da análise por agrupamento hierárquico (HCA) devido à formação de dois grupos, um formado exclusivamente por amostras industriais e outro com predominância de amostras naturais (Figura 24). Apesar disso, a distância entre os grupos não foi significativamente grande, demonstrando um pequeno grau de dissimilaridade entre as amostras analisadas.

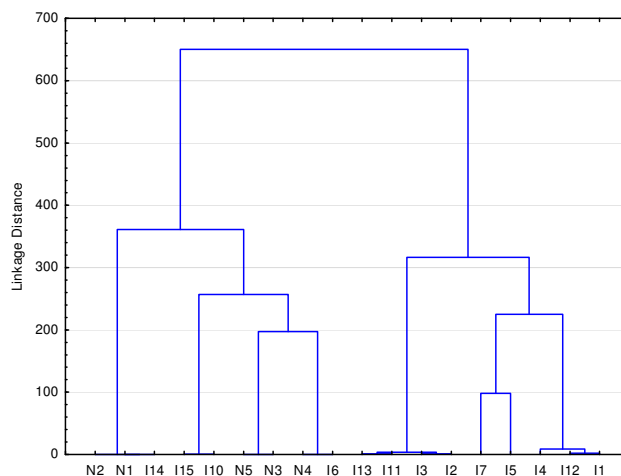


FIGURA 24 – Dendrograma para as amostras de água de coco industrial e artesanal em relação às concentrações de pesticidas; I = amostras de água de coco industrial e N = amostras de água de coco natural.

O fato de que foram observadas as maiores concentrações de resíduos de pesticidas nas amostras provenientes de processo industrial pode ser explicada pelas grandes áreas plantadas pela indústria, fazendo com que a aplicação dessas substâncias possibilite um melhor controle sobre a ação de pragas nas lavouras a fim de não prejudicar a produção de grandes volumes da bebida.

4.3.2 Vinho branco

Na Figura 25 são mostrados os cromatogramas obtidos para duas das amostras de vinho branco analisadas.

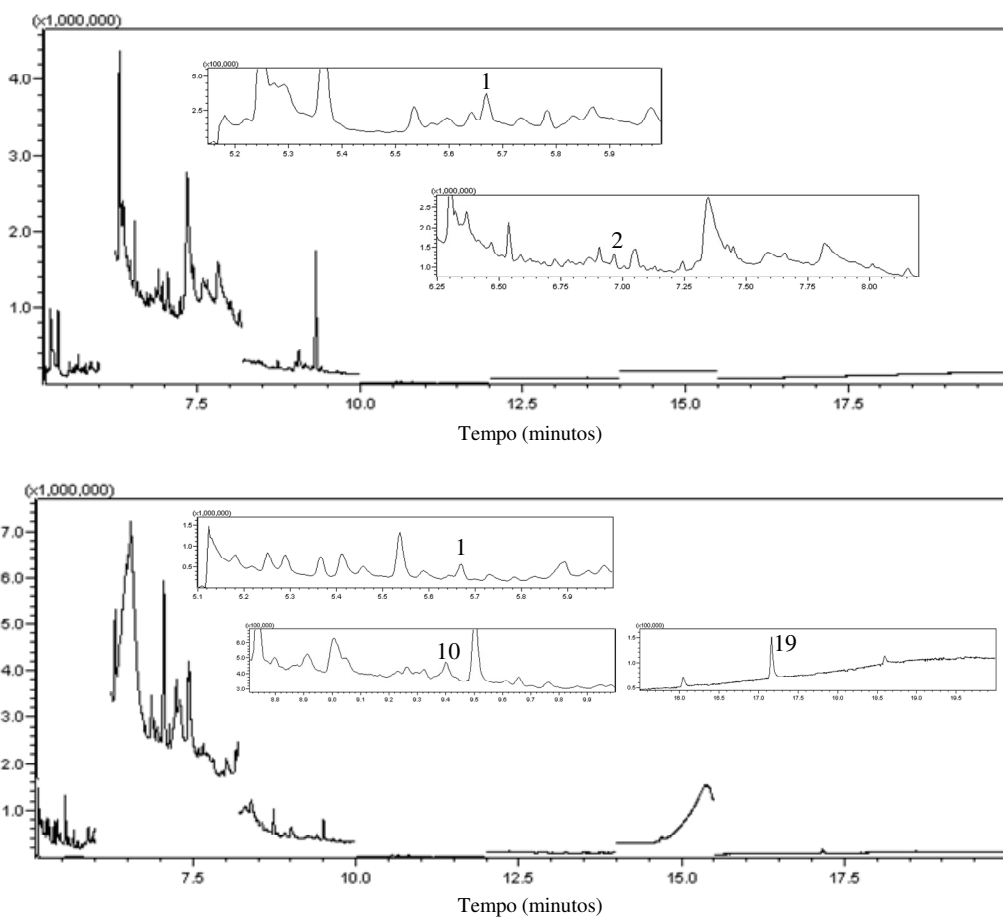


FIGURA 25 – Cromatogramas obtidos por GC-MS (modo TIC) de duas amostras de vinho branco. Identificação dos picos: 1 - carbofuran; 2 - molinate; 3 - sulfotep; 4 - dimethoate; 5 - demeton-O; 6 - diazinon; 7 - disulfoton; 8 - methyl parathion; 9 - fenitrothion; 10 - malathion; 11 - fenthion; 12 - dursban; 13 - parathion; 14 - endosulfan; 15 - ethion; 16 - bifenthrin; 17 - permethrin I; 18 - permethrin II; 19 - azoxystrobin.

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos para a análise de 19 pesticidas em amostras reais de vinho branco.

TABELA 12 – Concentração dos pesticidas ($\mu\text{g L}^{-1}$) encontrados nas amostras de vinho branco^a

Pesticidas	Amostras ($\mu\text{g L}^{-1}$)									MRL (mg kg^{-1}) ^b
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
carbofuran	16,5 ± 2,39	31,7 ± 2,58	9,67 ± 0,82	ND	5,37 ± 0,15	9,56 ± 0,19	11,3 ± 1,43	9,08 ± 1,43	15,1 ± 0,35	0,01
molinate	ND	<LQ	ND	ND	ND	<LQ	<LQ	<LQ	ND	0,05
sulfotep	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	não mencionado
dimethoate	ND	9,68 ± 1,57	ND	ND	<LQ	ND	ND	ND	ND	0,02
demeton-O	ND	ND	ND	ND	<LQ	ND	ND	ND	ND	0,01
diazinon	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,01
disulfoton	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,01
methyl parathion	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,01
fenitrothion	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<LQ	ND	0,01
malathion	3,91 ± 0,17	ND	ND	ND	3,41 ± 0,19	3,25 ± 0,05	ND	ND	ND	0,02
fenthion	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,01
dursban	ND	ND	8,77 ± 1,12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,5
parathion	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05
endosulfan	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05
ethion	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,01
bifenthrin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,2
permethrin I	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05 ^c
permethrin II	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05 ^c
azoxystrobin	6,53 ± 0,61	ND	<LQ	ND	ND	ND	ND	ND	<LQ	2,0

^a Média ± desvio padrão (n = 3); ND = não detectado; <LQ = menor que o limite de quantificação; ^b Níveis Máximos de Resíduos (Maximum Residue Levels) para uvas e uvas para vinhos (European Union, 2013); ^c Permethrin: MRL para soma dos isômeros.

Por meio dos resultados obtidos pode-se constatar que as concentrações de pesticidas nas amostras analisadas variaram de <LD a 31,7 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foi possível detectar a presença dos pesticidas carbofuran, molinate, dimethoate, demeton-O, fenitrothion, malathion, dursban e azoxystrobin, com destaque para o carbofuran que apresentou as maiores concentrações nas amostras de vinho branco, além de estar presente em um maior número de amostras analisadas.

Por meio da análise de carbamatos em uvas, Fernández et al. (2000) destacaram a presença de carbofuran em concentrações que variaram de 0,3 a 0,5 mg kg^{-1} nas amostras analisadas. Diante dos resultados obtidos por estes autores pode-se observar que este pesticida tem sido utilizado nas plantações de uvas, representando um risco de contaminação de vinhos caso as uvas sejam utilizadas na produção desta bebida, uma vez que esta substância foi encontrada em maiores concentrações nas amostras de vinho branco analisadas neste estudo.

Em um estudo sobre resíduos de pesticidas em amostras de vinhos italianos de procedência conhecida, foi constatada a presença dos seguintes pesticidas com as respectivas faixas de concentração: benomyl (0,05 mg L^{-1}), dimethoate (0,02–0,06 mg L^{-1}), iprodione (0,02–0,07 mg L^{-1}), metalaxyl (0,04–0,14 mg L^{-1}) e vinclozolin (0,02 mg L^{-1}) (Cus et al., 2010a). Estes mesmos autores ainda citam que após a fermentação, a quantidade de resíduos de pesticidas no vinho apresenta-se menor que aquela encontrada em uvas e no mosto, com exceção de pesticidas como azoxystrobin, dimethoate e pyrimethanil que não tem preferência de partição entre as fases líquida e sólida. Assim, os resíduos dessas substâncias podem estar presentes no vinho nas mesmas concentrações ou menor que nas uvas (Cabras et al., 1995; Cabras & Angioni, 2000).

Garbi et al. (2010) desenvolveram um trabalho similar a este estudo por meio da análise de seis pesticidas (diazinon, dimethoate, chlorpyrifos, vinclozolin, fenthion e quinalphos) em amostras de vinho usando SDME/GC-MS, os quais não foram detectados nas amostras analisadas. Vale ressaltar a maior robustez do método proposto neste estudo, comparado aos mencionados na literatura, uma vez que engloba um maior número de pesticidas analisados simultaneamente em amostras de vinho utilizando SDME, com valores satisfatórios para as figuras de mérito obtidos nos procedimentos de validação. Dos pesticidas analisados pelos autores citados, constatou-se a presença de dimethoate e chlorpyrifos (dursban) nas amostras analisadas neste estudo, com concentrações máximas de 9,68 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 8,77 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Apesar de não haver uma legislação específica que estabeleça limites para as concentrações de pesticidas em vinhos, a legislação europeia recomenda alguns limites para a presença de pesticidas em uvas para a produção de vinhos (European Union, 2013). Conforme

mencionado por Martins et al. (2011), a concentração de pesticidas em vinhos normalmente deve apresentar-se mais baixa que em uvas, o que indica que as concentrações dos pesticidas presentes na bebida devem estar abaixo dos limites estabelecidos pela legislação para uvas, já que não há legislação vigente para a presença destas substâncias em vinhos. Deste modo, observou-se que nenhum dos pesticidas encontrados nas amostras analisadas, neste trabalho, apresentou-se acima dos limites estabelecidos para uvas, considerando suas proporções em massa.

Com relação aos aspectos toxicológicos dos pesticidas encontrados nas amostras de vinho branco, pode-se observar na Tabela 13 que a quantidade em massa de pesticidas consumida em uma taça de vinho é inferior àquelas consideradas como limite máximo regulamentado pela legislação para uvas e como DL₅₀ (European Union, 2013; IUPAC, 2013). Apesar disso, vale salientar a propriedade de bioacumulação destas substâncias (Alavanja & Bonner, 2012; Guimarães et al., 2013; Hernández et al., 2013), o que pode ser prejudicial à saúde a longo prazo, considerando um consumo frequente da bebida. Assim, torna-se de extrema importância o incentivo ao desenvolvimento de estudos toxicológicos mais aprofundados sobre a presença dessas substâncias no vinho branco.

TABELA 13 – Quantidade de pesticida ingerida (μg) por taça de vinho (150 mL) consumida

Pesticidas	Concentração máxima encontrada nas amostras ($\mu\text{g L}^{-1}$)	μg pesticida/150 mL vinho	DL₅₀ (mg kg^{-1})^a	MRL^b (mg kg^{-1})
carbofuran	31,7	4,75	0,1	0,01
molinate	<1,28	<0,19	1,0	0,05
dimethoate	9,68	1,45	0,18	0,02
demeton-O	<3,26	<0,49	não especificado	0,01
fenitrothion	<3,47	<0,52	não especificado	0,01
malathion	3,91	0,59	não especificado	0,02
dursban	8,77	1,31	1,0	0,5
azoxystrobin	6,53	0,98	10	2,0

^a Ingestão a curto prazo (IUPAC, 2013); ^b Níveis Máximos de Resíduos (Maximum Residue Levels) para uvas e uvas para vinhos (European Union, 2013).

5 CONCLUSÕES

Após realização dos procedimentos de otimização dos parâmetros para SDME, constatou-se que a melhor eficiência de extração dos pesticidas foi obtida para os seguintes parâmetros: tolueno (solvente de extração), 30 minutos (tempo de extração), 1,0 μL (volume da gota), 10 mL (volume de solução), 200 rpm (velocidade de agitação), acidificação do meio com HCl e sem adição de sal.

A avaliação da influência da graduação alcoólica possibilitou verificar que para bebidas com teor alcoólico até 15% (v/v) não há influência significativa na extração dos pesticidas. Acima deste valor, houve uma diminuição na eficiência de extração dos compostos. Deste modo, o método mostrou-se apto para ser aplicado em matrizes aquosas ou alcoólicas, com graduação alcoólica até 15% (v/v).

O método proposto foi validado com êxito, obtendo-se bons valores para as figuras de mérito, para a determinação de pesticidas em amostras de água de coco e vinho branco.

O método mostrou-se rápido, robusto, abrangente e eficiente para a identificação e quantificação simultânea de 19 pesticidas (carbofuran, molinate, sulfotep, demeton-O, dimethoate, diazinon, disulfoton, methyl parathion, fenitrothion, malathion, fenthion, dursban, parathion, endosulfan, ethion, bifenthrin, permethrin e azoxystrobin) de diferentes classes químicas (organofosforado, organoclorado, piretróide, carbamato, tiocarbamato e estrobilurina) em amostras reais de água de coco e vinho branco.

Após aplicação do método na análise de amostras reais de água de coco industrializada e natural constatou-se a presença dos pesticidas sulfotep, demeton-O, dimethoate, disulfoton, fenitrothion e malathion em concentrações que variaram de <LQ a 12,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (dimethoate). As maiores concentrações de pesticidas foram encontradas para as amostras de água de coco industrializadas uma vez que há uma grande aplicação destas substâncias pela indústria, a qual apresenta grandes áreas de plantações de coqueiros, para garantir bom desempenho na produção diante do mercado competitivo.

De um total de 19 pesticidas estudados, oito (carbofuran, molinate, dimethoate, demeton-O, fenitrothion, malathion, dursban e azoxystrobin) foram identificados e quantificados em amostras reais de vinho branco, com concentrações abaixo de 31,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, destacando-se a presença de carbofuran na maioria das amostras analisadas.

6 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Aplicar o método desenvolvido em outros tipos de matrizes e de diferentes naturezas (aquosa e/ou alcoólica).

Desenvolver um método para a determinação de pesticidas por HS-SDME para ser aplicado em matrizes onde há dificuldade em visualizar a microgota devido à coloração do meio como, por exemplo, vinho tinto.

Realizar um monitoramento da concentração de pesticidas em diferentes estágios do processo de produção do vinho (desde a uva até o produto final).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACADEMIA DO VINHO. **Regiões vinícolas no Brasil**. Disponível em: http://www.academiadovinho.com.br/_regiao_mostra.php?reg_num=BR. Acessado em: 13/12/2013.

AHMADI, F.; ASSADI, Y.; MILANI HOSSEINI, S. M. R.; REZAEI, M. Determination of organophosphorus pesticides in water samples by single drop microextraction and gas chromatography-flame photometric detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1101, n. 1-2, p. 307-312, 2006.

ALAVANJA, M. C.; BONNER, M. R. Occupational pesticide exposures and cancer risk: a review. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews**, v. 15, n. 4, p. 238-263, 2012.

ALDER, L.; GREULICH, K.; KEMPE, G.; VIETH, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS? **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p. 838-865, 2006.

ANDRUCH, V.; KOCÚROVÁ, L.; BALOGH, I. S.; SKRLÍKOVÁ, J. Recent advances in coupling single-drop and dispersive liquid-liquid microextraction with UV-vis spectrophotometry and related detection techniques. **Microchemical Journal**, v. 102, p. 1-10, 2012.

ANGIONI, A.; DEDOLA, F. Three years monitoring survey of pesticide residues in Sardinia wines following integrated pest management strategies. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 5, p. 4281-4289, 2013.

ARAGÃO, W. M.; RIBEIRO, MELO, M. F. V. Cultivares de coqueiro para a produção de coco seco: coqueiro Gigante vs híbridos. In: CINTRA, F. L. D.; FONTES, H. R.; PASSOS, E. E. M.; FERREIRA, J. M. S. (Ed.). **Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no Nordeste do Brasil**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009. 232 p.

ARAÚJO, L.; PRIETO, A.; TROCONIS, M. URRIBARRI, G.; SANDREA, W.; MERCADO, J. Determination of acidic herbicides in water samples by *in situ* derivatization, single drop microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 12, p. 2350-2354, 2011.

AWUA, A. K.; DOE, E. D.; AGYARE, R. Exploring the influence of sterilisation and storage on some physicochemical properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. **BioMed Central**, v. 4, p. 451-459, 2011.

AZEVÊDO, L. C. **Estudo de compostos carbonílicos e os respectivos ácidos hidroxialquil-sulfônicos em vinhos**. 2007. 159 p. Tese (Doutorado em Ciência - Química Analítica) - Universidade Federal da Bahia, Salvador.

BAIANO, A.; CONTE, A.; CONTÒ, F.; DEL NOBILE, M. A. Recent patents in wine industry. **Recent Patents on Engineering**, v. 7, p. 25-40, 2013.

- BAIRD, C. **Química ambiental**. 2 ed. Porto Alegre. Bookman, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 2006. 212 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 27, de 22 de julho de 2009. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 jul. 2009. Seção 1, p. 6.
- CABONI, P.; CABRAS, P. Pesticides' influence on wine fermentation. **Advances in food and nutrition research**, v. 59, p. 43-62, 2010.
- CABRAS, P.; GARAU, V. L.; MELIS, M.; PIRISI, F. M.; & SPANEDDA, L. Pesticide residues in Italian wines. **Italian Journal of Food Science**, v. 7, n. 2, p. 133-145, 1995.
- CABRAS, P.; ANGIONI, A. Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 967-973, 2000.
- CABRERA, L.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E. G. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região Sul do estado do RS. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1982-1986, 2008.
- CARLOS, E. A.; ALVES, R. D.; DE QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A. Simultaneous determination of the organochlorine and pyrethroid pesticides in drinking water by single drop microextraction and gas chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 8, p. 1217-1227, 2013.
- CARPINTEIRO, I.; RAMIL, M.; RODRÍGUEZ, M.; CELA, R. Determination of fungicides in wine by mixed-mode solid phase extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 7484-7492, 2010.
- CARR, M. K. V. The water relations and irrigation requirements of coconut (*Cocos nucifera*): a review. **Experimental Agriculture**, v. 47, n. 1, p. 27-51, 2011.
- CASTELLARIN, S. D.; PFEIFFER, A.; SIVILOTTI, P.; DEGAN, M.; PETERLUNGER, E.; DI GASPERO, G. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, p. 1381–1399, 2007.
- CHANG, Q.; ZHANG, J.; DU, X.; MA, J.; LI, J. Ultrasound-assisted emulsification solidified floating organic drop microextraction for the determination of trace amounts of copper in water samples. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v. 4, n. 2, p. 187-195, 2010.
- CHIDAMBARAM, S.; SINGARAJA, C.; PRASANNA, M. V.; GANESAN, M.; SUNDARARAJAN, M. Chemistry of tender coconut water from the Cuddalore Coastal Region in Tamil Nadu, India. **Natural Resources Research**, v. 22, n. 2, p. 91-101, 2013.
- CHRIST, K. L.; BURRITT, R. L. Critical environmental concerns in wine production: an integrative review. **Journal of Cleaner Production**, v. 53, p. 232-242, 2013.
- CUS, F.; CESNIK, H. B.; BOLTA, S. V.; GREGORCIC, A. Pesticide residues and microbiological quality of bottled wines. **Food Control**, v. 21, p. 150-154, 2010a.

CUS, F.; CESNIK, H. B.; BOLTA, S. V.; GREGORCIC, A. Pesticide residues in grapes and during vinification process. **Food Control**, v. 21, p. 1512–1518, 2010b.

DEBMANDAL, M.; MANDAL, S. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 241-247, 2011.

DEME, P.; AZMEERA, T.; KANJILAL, S.; JONNALAGADDA, P.; UPADHYAYULA, V. S. LC-MS/MS determination of organophosphorus pesticide residues in coconut water. **Food Analytical Methods**, p. 1-8, 2012.

DE VILLIERS, A., ALBERTS, P.; TREDoux, A. G. J.; NIEUWOUDT, H. H. Analytical techniques for wine analysis: An African perspective; a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 730, p. 2-23, 2012.

DORS, G. C.; PRIMEL, E. G.; FAGUNDES, C. A. A.; MARIOT, C. H. P.; BADIALE-FURLONG, E. Distribution of pesticide residues in rice grain and in its coproducts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 10, p. 1921-1930, 2011.

DUCA, G.; STURZA, R.; SIRETANU, L. Estimation of organic pesticide residues in wines of Moldova. **Clean – Soil, Air, Water**, v. 40, n. 6, p. 661–666, 2012.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema de produção para a cultura do coqueiro**. Editores: FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S.; SIQUEIRA, L. A. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 63p.

ENDO, S.; PFENNIGSDORFF, A.; GOSS, K. Salting-out effect in aqueous NaCl solutions: trends with size and polarity of solute molecules. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 1496-1503, 2012.

EPA – United States Environmental Protection Agency. **Water: Drinking Water Contaminants**. Disponível em: <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm>. Acesso em: 16/06/2013.

EUROPEAN UNION. *Pesticide EU-MRLs*. Regulation (EC) n° 396/2005. Disponível em: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=homepage&CFID=9521960&CFTOKEN=439771a63192575d-53E60B96-B174-9738-A79673D7B7C0AD46&jsessionid=24055fb27b8554435174TR. Acessado em: 25/06/2013.

FERNÁNDEZ, M.; PICÓ, Y.; MAÑES, J. Determination of carbamate residues in fruits and vegetables by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 871, p. 43–46, 2000.

FISHER, U. Wine aroma. In: BERGER, R. G. (Ed.) **Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. Berlin: Springer, 2007. p. 241-267.

FLAMINI, R.; PANIGHEL, A. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part II: the consumer protection. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p. 741-774, 2006.

FONTANA, A. R.; RODRÍGUEZ, I.; RAMIL, M.; ALTAMIRANO, J. C.; CELA, R. Liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry following sorptive microextraction for the

determination of fungicide residues in wine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, p. 767-775, 2011.

GAO, W.; CHEN, G. CHEN, Y.; LI, N.; CHEN, T.; HU, Z. Selective extraction of alkaloids in human urine by on-line single drop microextraction coupled with sweeping micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 5712-5717, 2011.

GARBI, A.; SAKKAS, V.; FIAMEGOS, Y. C.; STALIKAS, C. D.; ALBANIS, T. Sensitive determination of pesticides residues in wine samples with the aid of single-drop microextraction and response surface methodology. **Talanta**, v. 82, p. 1286-1291, 2010.

GEBLER, L.; PELIZZA, T. R.; ALMEIDA, D. L. Variáveis ambientais e toxicológicas de agroquímicos utilizados na Produção Integrada de Maçãs (PIM) visando modelagem matemática. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 5, n. 2, p. 169-184, 2006.

GOMEZ, F. J. V.; MONASTERIO, R. P.; VARGAS, V. C. S.; SILVA, M. S. Analytical characterization of wine and its precursors by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 33, p. 2240-2252, 2012.

GUILFORD, J. M.; PEZZUTO, J. M. Wine and health: a review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 62, n. 4, p. 471-486, 2011.

GUIMARÃES, R. M.; ASMUS, C. I. R. F.; BURDORF, A. Caracterização da exposição de população a organoclorados: uma aplicação da análise de cluster. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, n. 2, p. 231-239, 2013.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 868 p.

HE, Y.; LEE, H. K. Liquid-phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 22, p. 4634-464, 1997.

HERNÁNDEZ, A. F.; PARRÓN, T.; TSATSAKIS, A. M.; REQUENA, M.; ALARCÓN, R.; LÓPEZ-GUARNIDO, O. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. **Toxicology**, v. 307, p. 136-145, 2013.

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

HU, B.; HE, M.; CHEN, B.; XIA, L. Liquid phase microextraction for the analysis of trace elements and their speciation. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 86, p. 14-30, 2013.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em:
http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201310_1.shtm.
Acessado em: 09/12/2013.

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

ITO, M.; TAKAHASHI, M.; MIKAMI, N. Hydrolysis of fenitrothion in water as a function of pH at 25°C, Osaka, Japan, Sumitomo Chemical Co., Ltd (Unpublished Technical Report No. HM-80-0094), 1988.

IUPAC. **Global availability of information on agrochemicals**. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/index.htm>. Acessado em: 20/05/2013.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Solvent microextraction as a speciation tool: determination of free progesterone in a protein solution. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 15, p. 2935–2940, 1997a.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 235–239, 1997b.

JEANNOT, M. A.; PRZYJAZNY, A.; KOKOSA, J. M. Single drop microextraction - Development, applications and future trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2326-2336, 2010.

JIANG, H.; HU, B. Determination of trace Cd and Pb in natural waters by direct single drop microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry. **Microchimica Acta**, v. 161, p. 101-107, 2008.

JIN, B.; XIE, L.; GUO, Y.; PANG, G. Multi-residue detection of pesticides in juice and fruit wine: A review of extraction and detection methods. **Food Research International**, v. 46, p. 399-409, 2012.

KIN, C. M.; HUAT, T. G. Comparison of HS-SDME with SPME and SPE for the determination of eight organochlorine and organophosphorus pesticide residues in food matrices. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, p. 694-699, 2009.

KOKOSA, J. M. Advances in solvent-microextraction techniques. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 2-13, 2013.

KONING, S.; JANSEEN, H. G.; BRINKMAN, U. A. T. Modern methods of sample preparation for GC analysis. **Chromatographia**, v. 69, p. S33-S78, 2009.

LEE, J.; LEE, H. K. Fully automated dynamic in-syringe liquid-phase microextraction and on-column derivatization of carbamate pesticides with gas chromatography/mass spectrometric analysis. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 17, p. 6856-6861, 2011.

LESCHEV, S. M.; ZAYATS, M. F. Distribution constants of lower alcohols, acetone, and ethyl acetate in *n*-hexane–aqueous solutions of inorganic salt systems and the nature of the salting-out effect. **Russian Journal of Physical Chemistry A**, v. 86, n. 6, p. 965-968, 2012.

LI, L.; HU, B.; XIA, L.; ZIANG, Z. Determination of trace Cd and Pb in environmental and biological samples by ETV-ICP-MS after single-drop microextraction. **Talanta**, v. 70, p. 468-473, 2006.

LIANG, P.; LIU, R.; CAO, J. Single drop microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry for determination of lead in biological samples. **Microchimica Acta**, v. 160, p. 135-139, 2008.

- LIN, H.; WANG, J.; ZENG, L.; LI, G.; SHA, Y.; WU, D.; LIU, B. Development of solvent micro-extraction combined with derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 1296, p. 235–242, 2013.
- LÓPEZ-BLANCO, C.; GÓMEZ-ÁLVAREZ, S.; REY-GARROTE, M.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of carbamates and organophosphorus pesticides by SDME–GC in natural water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383, p. 557–561, 2005.
- MANZOORI, J. L.; AMJADI, M.; ABULHASSANI, J. Ultra-trace determination of lead in water and food samples by using ionic liquid-based single drop microextraction-electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 644, n. 1-2, p. 48-52, 2009.
- MARTINIS, E. M.; BERTON, P.; MONASTERIO, R. P.; WUILLOUD, R. G. Emerging ionic liquid-based techniques for total-metal and metal-speciation analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 1184-1201, 2010.
- MARTINS, J.; ESTEVES, C.; SIMÕES, T.; CORREIA, M.; DELERUE-MATOS, C. Determination of 24 pesticide residues in fortified wines by solid-phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6847-6855, 2011.
- MARTINS, C. R.; JESUS JÚNIOR, L. A. **Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional : panorama 2010**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2011. 28 p. il.
- MENEZES FILHO, A.; SANTOS, F. N.; PEREIRA, P. A. P. Development, validation and application of method based on DI-SPME and GC–MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and groundwater samples. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 139-145, 2010.
- MENEZES FILHO, A.; SANTOS, F. N.; PEREIRA, P. A. P. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC–MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. **Talanta**, v. 81, p. 346-354, 2011.
- MORAES, V.; LOCATELLI, C. Vinho: uma revisão sobre a composição química e benefícios à saúde. **Evidência**, v. 10, n. 1-2, p. 57-68, 2010.
- MORAGAS, W. M.; SCHNEIDER, M. O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos de Geografia**, v. 3, n. 10, p. 26-40, 2003.
- OGAWA, S.; BRITO, N. M.; SILVA, M. R. S.; RIBEIRO, M. L.; LEITE, L. A.; DÓREA, H. S.; NAVICKIENE, S.; ABAKERLI, R. B.; FERREIRA, J. M. S. Determination of carbofuran and 3-hydroxycarbofuran residues in coconut water by solid-phase extraction and liquid chromatography with UV detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, n. 12, p. 1833-1841, 2006.
- OIV – Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. **International Code of Oenological Practices**. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, n. 1, 2012.

OIV - International Organisation of Vine and Wine. **Statistical report on world vitiviniculture 2013**. Disponível em: <http://www.oiv.int/oiv/info/frstatsro?lang=fr>. Acessado em: 13/12/2013.

PAKADE, Y. B.; TEWARY, D. K. Development and applications of single-drop microextraction for pesticide residue analysis: A review. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 3683-3691, 2010.

PAKADE, Y. B.; SHARMA, R.; NADDA, G.; TEWARY, D. K. Analytical method for determination of organochlorine pesticides in tea brews using single-drop microextraction with GC-ECD. **International Journal of Food Properties**, v. 16, n. 4, 2013.

PARK, J. S.; SHIN, S. K.; KIM, W. I.; KIM, B. H. Residual levels and identify possible sources of organochlorine pesticides in Korea atmosphere. **Atmospheric Environment**, v. 45, n. 39, p. 7496-7502, 2011.

PARK, S. T.; KIM, J.; CHOI, K.; LEE, H. R.; CHUNG, D. S. Headspace-single drop microextraction with a commercial capillary electrophoresis instrument. **Electrophoresis**, v. 33, p. 2961-2968, 2012.

PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C.; VIDAL, L. CANALS, A. Speciation of mercury by ionic liquid-based single-drop microextraction combined with high-performance liquid chromatography-photodiode array detection. **Talanta**, v. 78, p. 537-541, 2009.

PÉREZ-SERRADILLA, J. A.; MATA-GRANADOS, J. M.; CASTRO, M. D. L. Low-Level Determination of organochlorine pesticides in wines by automatic preconcentration and GC-MS-MS detection. **Chromatographia**, v. 71, n. 9/10, p. 899-905, 2010.

PINHEIRO, A. S.; DE ANDRADE, J. B. Development, validation and application of a SDME/GC-FID methodology for the multiresidue determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. **Talanta**, v. 79, p. 1354-1359, 2009.

PINHEIRO, A. S.; ROCHA, G. O.; DE ANDRADE, J. B. A SDME/GC-MS methodology for determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. **Microchemical Journal**, v. 99, p. 303-308, 2011.

PRADES, A.; DONIER, M.; DIOP, N.; PAIN, J. P. Coconut water uses, composition and properties: a review. **Fruits**, v. 67, n. 2, p. 87-107, 2011.

PRADES, A.; ASSA, R. R. A.; DORNIER, M.; PAIN, J. P.; BOULANGER, R. Characterization of the volatile profile of coconut water from five varieties using an optimized HS-SPME-GC analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 2471-2478, 2012.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in single-drop microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 53-63, 2002.

QIAN, L-I.; HE, Y-Z. Funnel-form single-drop microextraction for gas chromatography-electron-capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, n. 1-2, p. 32-37, 2006.
RANASINGHE, C. S.; FERNANDO, W. P. K. K.; ZANEER, S. M. M.; MUBARAK, A. M. Analysis of residue levels in kernel and nut water of coconut palms injected with

monocrotophos. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 31, n. 3-4, p. 431-436, 2003.

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

RINCÓN, A. A.; PINO, V.; AYALA, J. H.; AFONSO, A. M. Headspace-single drop microextraction (HS-SDME) in combination with high-performance liquid chromatography (HPLC) to evaluate the content of alkyl- and methoxy-phenolic compounds in biomass smoke. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1265-1273, 2011.

RISSATO, S. R.; LIBÂNIO, M. GIAFFERIS, G. P.; GERENUTTI, M. Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP). **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 739-743, 2004.

RODRIGUES, F. M.; MESQUITA, P. R. R.; OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, F. S.; MENEZES FILHO, A.; PEREIRA, P. A. P.; DE ANDRADE, J. B. Development of a headspace solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry method for determination of organophosphorus pesticide residues in cow milk. **Microchemical Journal**, v. 98, p. 56-61, 2011.

SANTOS, L. F. S.; SOUZA, N. R. S.; FERREIRA, J. A.; NAVICKIENE, S. A reversed-phase high-performance liquid chromatography method combined with matrix solid-phase dispersion extraction for the determination of teflubenzuron, lufenuron and bifenthrin residues in lyophilized coconut water. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, p. 183-188, 2012.

SEN, K.; CABAROGLU, T.; YILMAZ, H. The influence of fining agents on the removal of some pesticides from white wine of *Vitis vinifera* L. cv. Emir. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 3990-3995, 2012.

SHA, Y.; MENG, J.; LIN, H.; DENG, C.; LIU, B. Development of single-drop microextraction and simultaneous derivatization followed by GC-MS for the determination of aliphatic amines in tobacco. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 9, p. 1283-1287, 2010.

SHRIVAS, K.; WU, H. Ultrasonication followed by single-drop microextraction combined with GC/MS for rapid determination of organochlorine pesticides from fish. **Journal of Separation Science**, v. 31, p. 380-386, 2008.

SHUNTHIRASINGHAM, C.; OYILIAGU, C. E.; CAO, X.; GOUIN, T.; WANIA, F.; LEE, S. C.; POZO, K.; HARNER, T.; MUIR, D. C. G. Spatial and temporal pattern of pesticides in the global atmosphere. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 12, p. 1650-1657, 2010.

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

SILVA, J. M.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B. Aplicação da cromatografia gasosa bidimensional abrangente com microdetector de captura de elétrons para determinação de agrotóxicos em sedimentos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 962-967, 2011.

- SPADOTTO, C. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. **Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar - FMR**, São Manuel, 9p., 2006.
- STEINER, I.; DESSER, A. Coconut water – composition, properties and processing. **Ernährung/Nutrition**, v. 32, p. 513–516, 2008.
- TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 135-142, 2002.
- TUZIMSKI, T. Determination of pesticides in wines samples by HPLC-DAD and HPTLC-DAD. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 35, n. 10, p. 1415-1428, 2012.
- WEN, X.; DENG, Q.; WANG, J.; YANG, S.; ZHAO, X. A new coupling of ionic liquid based-single drop microextraction with tungsten coil electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 105, p. 320-325, 2013.
- WOOD, D. C.; MILLER, J. M.; CHRIST, I. Headspace liquid microextraction. **LCGC North America**, v. 22, n. 6, p. 516-522, 2004.
- WYNN, N. R.; COOPER, J. F.; ZHENG, S. Q.; CABANIS, J. C. Procymidone residues determination in wine: Immuno-assays and mass detection-gas chromatography. **Bull de l'O.I.V.**, 749-750, p. 551–557, 1993.
- XIAO, Q.; YU, C.; XING, J.; HU, B. Comparison of headspace and direct single-drop microextraction and headspace solid-phase microextraction for the measurement of volatile sulfur compounds in beer and beverage by gas chromatography with flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1125, n. 1, p. 133-137, 2006.
- XU, L.; BASHEER, C.; LEE, H. K. Developments in single-drop microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 184–192, 2007.
- YANG, C.; WANG, J.; LI, D. Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 799, p. 8-22, 2013.
- YE, C.; ZHOU, Q.; WANG, X. Improved single-drop microextraction for high sensitive analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1139, n. 1, p. 7–13, 2007.
- YOUNG, J. W. H.; GE, L.; NG, Y. F.; TAN, S. N. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. **Molecules**, v. 14, p. 5144-5164, 2009.
- ZANJANI, M. R. K.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S.; JÖNSSON, J. A. A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, p. 286-293, 2007.
- ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 722-731, 2009.

ZHANG, M.; HUANG, J.; WEI, C.; YU, B.; YANG, X.; CHEN, X. Mixed liquids for single-drop microextraction of organochlorine pesticides in vegetables. **Talanta**, v. 74, p. 599-604, 2008.

ZHAO, E.; HAN, L.; JIANG, S.; WANG, Q.; ZHOU, Z. Application of a single-drop microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in juice. **Journal of Chromatography A**, v. 1114, p. 269-273, 2006.

ANEXO

1 Artigo publicado

Microchemical Journal 112 (2014) 119–126

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

 **Microchemical Journal** 

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




Determination of nineteen pesticides residues (organophosphates, organochlorine, pyrethroids, carbamate, thiocarbamate and strobilurin) in coconut water by SDME/GC–MS







Jeancarolo Pereira. dos Anjos, Jailson B. de Andrade *


*Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, 40170-290 Salvador, BA, Brazil
Centro Interdisciplinar de Energia e Ambiente – CIEnAm, Universidade Federal da Bahia, Ondina 40170-290 Salvador, BA, Brazil
INCT de Energia e Ambiente, UFBA, 40170-290 Salvador, BA, Brazil*

2 Artigo submetido para publicação

Fwd: A manuscript number has been assigned: MICROC-D-13-00682  Entrada x  

 **Jailson de Andrade** <jailsondeandrade@gmail.com> 06/12/13 ☆  

para mim 

 inglês > português Traduzir mensagem Desativar para: inglês x

----- Forwarded message -----
From: J. Sneddon <jsneddon@mcneese.edu>
Date: 2013/12/6
Subject: A manuscript number has been assigned: MICROC-D-13-00682
To: jailson@ufba.br, jailsondeandrade@gmail.com

Ms. Ref. No.: MICROC-D-13-00682
Title: MULTIRESIDUE METHOD FOR PESTICIDE DETERMINATION IN WHITE WINE BY SDME/GC-MS
Microchemical Journal

Dear JB,

Your submission entitled "MULTIRESIDUE METHOD FOR PESTICIDE DETERMINATION IN WHITE WINE BY SDME/GC-MS" has been assigned the following manuscript number: MICROC-D-13-00682.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/microc/>.