



Universidade Federal do Maranhão.  
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia.  
Programa de Pós Graduação em Química.

**Dissertação de Mestrado**

**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO  
DO INSETICIDA BIFENTRINA EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS  
INDUSTRIALIZADOS**

**Thaynara Ferreira Soares**

**São Luís - MA  
2018**

**THAYNARA FERREIRA SOARES**

**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO  
INSETICIDA BIFENTRINA EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS  
INDUSTRIALIZADOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Maranhão, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Química – PPGQuim, para obtenção do título de Mestre em Química.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gilvanda Silva Nunes.

**São Luís – MA**

**2018**

Título: “Otimização de método analítico para determinação do inseticida bifentrina em amostras de alimentos industrializados.”

**Thaynara Ferreira Soares**  
**Aprovado em 16 de Março de 2018.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gilvanda Silva Nunes (Orientadora-UFMA)

---

Prof. Dr. Paulo Villis (UNICEUMA)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Quintino da Rocha (UFMA)

## AGRADECIMENTOS

À Jesus Cristo, por Seu imenso amor e misericórdia, a Ti toda honra, glória e louvor!

À Universidade Federal do Maranhão, pela oportunidade.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida.

Aos meus pais, meu porto seguro, que investiram na minha educação e me encorajaram a lutar pela conquista do conhecimento.

Aos meus familiares, que sempre me apoiaram com amor, carinho e atenção.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Gilvanda Nunes, pelo apoio, orientação e motivação.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Cáritas Mendonça, por ter sido a minha segunda mãe, ter-me mostrado o caminho e como eu deveria trilhar. As palavras tornam-se insignificantes mediante a minha admiração pela senhora.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Cláudia Rocha, pela atenção e ensinamentos compartilhados durante essa jornada.

Ao Professor Dr. Arlan Freitas, pelo apoio e incentivo durante a realização das etapas experimentais.

Aos colegas do NARP e de turma, pelo companheirismo e por compartilharem comigo do aprendizado.

Aos funcionários da UFMA, principalmente ao corpo docente do PPG-Quim, pela ajuda na conclusão de mais essa etapa acadêmica.

A todos que não mencionei, mas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização dessa pesquisa, a minha eterna gratidão

*“Em todo o Universo não há nada que possa nos separar do amor de Deus, que é nosso por meio de Cristo Jesus, o nosso Senhor”.*

*(Romanos 8:38)*

## RESUMO

O inseticida piretróide bifentrina tem sido amplamente usado para controle de pragas, não só nas lavouras, como também em ambientes industriais e em estabelecimentos comerciais. Se o controle integrado de pragas não for realizado adequadamente, existe o risco de contaminação dos produtos de prateleira. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e comparar dois métodos analíticos, baseados na cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons (CG/DCE) e na cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por arranjos de fotodiodos (CLAE/DAD), para determinação do inseticida bifentrina em amostras de alimentos industrializados com variadas composições e características. Após otimização da separação por CLAE/DAD e CG/DCE, amostras de alimentos representativas do todo amostral (elevado teor de umidade/baixo teor de lipídeos e baixo teor de umidade/elevado teor de lipídeos) foram submetidas a testes para otimização das condições analíticas. Assim, foram variadas as condições para as etapas de extração em forno microondas e de *clean up* empregando extração em fase sólida (EFS) em coluna de Florisil ativado. Depois, procedeu-se à avaliação dos métodos previamente otimizados, mediante comparação das seguintes figuras de mérito: linearidade, sensibilidade, exatidão e precisão. Para ambos os métodos, foi constatada adequada seletividade e elevada exatidão, com índices de recuperações nas faixas de 86,4-101,1% e de 99,5-90% para CLAE/DAD e para CG/DCE, respectivamente. Os coeficientes de variação abaixo de 5% evidenciaram elevada precisão para ambos os métodos. Em relação à sensibilidade, porém, o método baseado na técnica CG/DCE mostrou-se mais eficiente, com valores de LD e LQ de 2,1 ng/L e 7,1 ng/L, respectivamente, enquanto que o método baseado em CLAE/DAD apresentou valores de LD e LQ de 7,4ng/L e 24,5ng/L, respectivamente. Com isso, o método baseado na técnica CG/DCE foi selecionado para analisar 22 amostras de alimentos industrializados, supostamente contaminados com o pesticida bifentrina, bem como algumas das embalagens. Os resultados evidenciaram ausência de contaminação nos alimentos tomados para análise, tendo sido a metodologia analítica considerada adequada para análise de rotina de amostras complexas, por sua elevada eficiência e rapidez, e custo relativamente baixo.

**Palavras-chaves:** alimentos industrializados, bifentrina, método analítico.

## ABSTRACT

The bifenthrin pyrethroid insecticide has been widely used for pest control, not only in crops, but also in industrial settings and commercial establishments. If integrated pest control is not performed properly, there is a risk of contamination of shelf products. The objective of this work was to develop and compare two analytical methods based on gas chromatography with electron capture detection (GC/ECD) and high performance liquid chromatography coupled to diode array detector (HPLC/DAD), for determination of bifenthrin insecticide in samples of industrialized foods with varied compositions and characteristics. After optimization of the separation by HPLC/DAD and GC/ECD, representative samples of the whole sample (high moisture content/low lipid content and low moisture content/high lipid content) were submitted to numerous tests in order to optimize the analytical conditions. Thus, the conditions for the microwave extraction and clean up through using solid phase extraction (EFS) in activated Florisil column were optimized. Then, the previously optimized methods were evaluated by comparing the following figures of merit: linearity, sensitivity, accuracy and precision. For both methods, adequate selectivity and high accuracy were observed, with recoveries ranging from 86.4 to 101.1% and from 99.5 to 90% for CLAE/DAD and CG/ECD, respectively. Coefficients of variation <5% evidenced high precision for both methods. Regarding sensitivity, however, the method based on CG/ECD was more efficient, with LD and LQ values of 2.1 ng/L and 7.1 ng/L, respectively, whereas the method based on HPLC/DAD presented values of LD and LQ of 7.4 ng/L and 24.5 ng/L, respectively. Thus, the method based on the CG/ECD technique was selected to analyze 22 samples of supposedly contaminated foodstuffs as well as some of the packages. The results evidenced the absence of contamination in the samples, being the analytical methodology considered adequate for routine analysis of complex samples, since it presented high efficiency, quickness and relatively low cost.

**Keywords:** industrialized foods, bifenthrin, analytical method.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Trabalhos recentes envolvendo análises de pesticidas em diferentes matrizes, empregando a técnica EFS .....	33
<b>Tabela 2.</b> Características físico-químicas dos inseticidas piretróides comumente empregados para proteção de alimentos industrializados.....	35
<b>Tabela 3.</b> Métodos mais recentes, publicados na literatura, para determinação de bifentrina em alimentos in natura e industrializados.....	36
<b>Tabela 4.</b> Alimentos industrializados tomados para análise pelo método otimizado no presente estudo .....	44
<b>Tabela 5.</b> Produtos tomados como representativos dos grupos de alimentos ricos ou pobres em umidade e lipídeos.....	45
<b>Tabela 6.</b> Condições otimizadas para a separação cromatográfica do inseticida bifentrina - técnica CLAE/DAD .....	47
<b>Tabela 7.</b> Condições otimizadas para a separação cromatográfica do inseticida bifentrina - técnica CG/DCE .....	50
<b>Tabela 8.</b> Dados das curvas de calibração para o inseticida bifentrina, obtidos com as duas técnicas cromatográficas .....	51
<b>Tabela 9.</b> Sensibilidade obtidas para análise do inseticida piretróide bifentrina mediante as diferentes técnicas cromatográficas.....	54
<b>Tabela 10.</b> Exatidão dos métodos para análise do inseticida piretróide bifentrina, baseados nas diferentes técnicas cromatográficas .....	56



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química da bifentrina.....	25
<b>Figura 2.</b> Procedimento de extração em fase sólida.....	31
<b>Figura 3.</b> Procedimento de purificação (clean up) dos extratos de alimentos industrializados para fins de análise do inseticida bifentrina .....	41
<b>Figura 4.</b> Sistemas cromatográficos-(a)Cromatógrafo a líquido equipado com detector de arranjo de fotodiodos; (b) Cromatógrafo a gás equipado com detector de captura de elétrons.....	42
<b>Figura 5.</b> Picos cromatográficos do padrão do inseticida bifentrina: sensibilidade instrumental em diferentes comprimentos de onda .....	48
<b>Figura 6.</b> Cromatograma do padrão de bifentrina após otimização de separação por CLAE/DAD.....	49
<b>Figura 7.</b> Cromatograma do padrão de bifentrina, após otimização da separação por CG/DCE.....	50
<b>Figura 8.</b> Curvas de calibração obtidas mediante as técnicas por CLAE/DAD (a) e CG/DCE (b).....	52
<b>Figura 9.</b> Cromatogramas das amostras não dopadas (à esquerda) e dopadas (à direita) dos seguintes alimentos industrializados: extrato de tomate (a) e do biscoito wafer (b) - método baseado na CLAE/DAD .....	57
<b>Figura 10.</b> Cromatogramas das amostras não dopadas (à esquerda) e dopadas (à direita) dos seguintes alimentos industrializados: extrato de tomate (a) e biscoito wafer (b) - método baseado na CG/DCE .....	58

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrila  
APAA - Laboratório de Análises e Pesquisas de Alimentos, Bebidas e Ambiental  
AOAC – Official Methods of Analysis  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - Diclorometano  
CHCl<sub>3</sub> - Clorofórmio  
CH<sub>3</sub>COONa - Acetato de sódio  
CG - Cromatografia a gás  
CGL - Cromatografia gás-líquido  
CGS - Cromatografia gás-sólido  
CIP - Controle integrado de pragas  
CIPAC - Collaborative International Pesticides Analytical Council  
CLAE - Cromatografia a líquido  
CV - Coeficiente de variação  
DAD - Detector de arranjo de diodos  
DCE - Detector por captura de elétrons  
DCM - Diclorometano  
DDA - Dose diária aceitável  
EtAc - Acetato de etila  
EAM - Extração assistida por forno microondas  
HAc - Ácido acético  
IAL - Instituto Adolfo Lutz  
IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada  
LD - Limite de detecção  
LQ - Limite de quantificação  
MeOH - Metanol  
MgSO<sub>4</sub> - Sulfato de magnésio  
MS - Detector por espectrometria de massas  
MSPD- Extração por dispersão da matriz em fase sólida  
N<sub>2</sub> - Nitrogênio  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
PLL - Extração por partição líquido-líquido  
t<sub>R</sub> - Tempo de retenção

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>2.1 Geral</b> .....	<b>27</b>
<b>2.2 Específicos</b> .....	<b>27</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1 Os Pesticidas e os Inseticidas Piretróides</b> .....	<b>28</b>
3.1.1 <i>Bifentrina</i> .....	30
<b>3.2 Procedimentos Para Preparo de Amostras para Análise de Pesticidas em Alimentos</b> .....	<b>31</b>
<b>3.3. Determinação de Pesticidas em Alimentos</b> .....	<b>34</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1 Soluções, Reagentes e Demais Materiais</b> .....	<b>38</b>
<b>4.2 Equipamentos e Acessórios</b> .....	<b>38</b>
<b>4.3 Amostragem</b> .....	<b>38</b>
<b>4.4 Análises dos Alimentos</b> .....	<b>39</b>
4.4.1 <i>Determinação da umidade</i> .....	39
4.4.2 <i>Determinação de lipídeos</i> .....	39
<b>4.5 Preparo dos Extratos</b> .....	<b>40</b>
<b>4.6 Otimização dos Métodos</b> .....	<b>41</b>
4.6.1 <i>Seletividade</i> .....	42
4.6.2 <i>Linearidade</i> .....	42
4.6.3 <i>Sensibilidade</i> .....	43
4.6.4 <i>Exatidão</i> .....	43
4.6.5 <i>Precisão</i> .....	43
<b>4.7 Análise Estatística para Comparação dos Métodos</b> .....	<b>43</b>
<b>4.8 Análises das Amostras de Alimentos</b> .....	<b>44</b>
<b>5. RESULTADO E DISCUSSÕES</b> .....	<b>45</b>
<b>5.1 Análises dos Alimentos</b> .....	<b>45</b>
5.1.1 <i>Teor de Umidade e Lipídeos</i> .....	45
<b>5.2 Extração Assistida por Microondas</b> .....	<b>46</b>
<b>5.3 Otimização do Método por CLAE/DAD</b> .....	<b>47</b>
<b>5.4 Otimização da Separação por CG/DCE</b> .....	<b>49</b>
<b>5.5 Comparação das Figuras de Mérito</b> .....	<b>51</b>
5.5.1 <i>Linearidade</i> .....	51
5.5.2 <i>Seletividade</i> .....	53

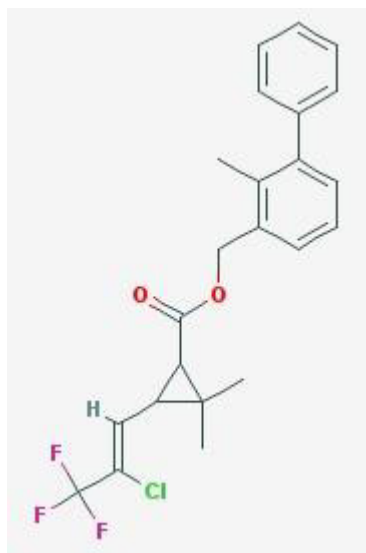
5.5.3 <i>Sensibilidade</i> .....	53
5.5.4 <i>Exatidão e Precisão</i> .....	55
<b>5.6 Análise dos Alimentos Industrializados e Embalagens</b> .....	<b>59</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>61</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>68</b>
<b>Anexo 1:</b> Cromatogramas das amostras de alimentos industrializados a (vide tabela 3) .....	<b>69</b>
<b>Anexo 2:</b> Cromatogramas das amostras de embalagens .....	<b>80</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A busca pelo controle de qualidade dos alimentos tem-se tornado uma preocupação mundial. Dentro desse controle, considera-se a análise de resíduos de pesticidas de suma importância, devido ao aparecimento de resíduos de agroquímicos que podem estar presentes nesses alimentos, até mesmo nos industrializados. Desta maneira, torna-se necessária a fiscalização e a investigação de possíveis contaminantes que podem ser incorporados aos alimentos, não só por ocasião da produção agrícola (JURASKE et al., 2009) como também durante o Controle Integrado de Pragas (CIP) realizado pelas indústrias ou estabelecimentos comerciais.

Dentre os inseticidas mais aplicados para controle de pragas em ambientes comerciais, encontram-se os piretróides. Estes compostos têm sido comercializados em todo o mundo e são sintetizados a partir da modificação estrutural da piretrina, inseticida natural presente na flor de *Crisântemo cineraraefolium* (YOSHIDA, 2009). O processo de síntese está atrelado à estabilidade desses compostos, tendo em vista que as piretrinas naturais são compostos fotossensíveis (WANG et al., 2017). Dentre as peculiaridades dos piretróides sintéticos, destaca-se a sua elevada toxicidade a mamíferos, fator este que poderá ocasionar sérios riscos à saúde pública, devido à ingestão, inalação ou contato dérmico (SAILLENFAIT, NDIAYE e SABATÉ, 2016).

O pesticida piretróide “bifentrina” (Figura 1) está inserido na classe dos inseticidas, formicidas e acaricidas, e tem sido muito empregado para fins de controle em ambientes que comercializam alimentos industrializados (SAMSIDAR, SIDDIQUEE e SHAARANI, 2018). Esse composto possui ingestão diária aceitável (TDA) de 0,02 mg/kg de peso corpóreo (ANVISA, 2003). Altas dosagens desse composto em mamíferos podem ocasionar efeitos nocivos, tais como tremores no corpo, movimento desordenado, postura anormal e convulsões. Além disso, a bifentrina tem sido considerada uma substância possivelmente carcinogênica (BARRIGOSI, LANNA e FERREIRA, 2005).



**Figura 1.** Estrutura química da bifentrina. Fonte: PubChem (2004).

Diversos métodos para análise da bifentrina têm sido publicados nos últimos anos em matrizes de água (FEO, ELJARRAT e BARCELÓ, 2010), de vegetais (QIN et al., 2015), de grãos (LOZOWICKA et al., 2014), de frutas (WANG et al., 2018) e de peixes (FORSGREN, RIAR e SCHLENK, 2013), empregando CLAE acoplada a diferentes detectores. As técnicas por cromatografia a gás acoplada com detector por captura de elétrons (CG/DCE) (SLOWIK-BOROWIEC, SZPYRKA e WALORCZYK, 2015; LIU et al., 2015 e MIAO et al., 2013) ou por espectrometria de massas (CG/EM) (TIENSTRA et al., 2015 e WALORCZYK, 2014) também têm sido amplamente empregadas para detecção da bifentrina em amostras de alimentos. Em todos os métodos, os procedimentos de tratamento da amostra são em geral demorados e as eficiências relativamente baixas, com índices de recuperação não raro abaixo de 85% (SLOWIK-BOROWIEC, SZPYRKA e WALORCZYK, 2015; LIU et al., 2015; MIAO et al., 2013).

Mesmo com a publicação de métodos oficiais, diversos laboratórios desenvolvem a sua própria metodologia, e isso depende do analito e das condições laboratoriais. Diversos procedimentos podem ser modificados e/ou adaptados, como a etapa de tratamento prévio e configurações do equipamento, tornando difícil a obtenção de um método padronizado universalmente (GRIMALT e DEHOUCK, 2016).

Apesar do quantitativo de pesquisas científicas concernentes ao

inseticida bifentrina em alimentos *in natura* ser bastante expressivo, quando se trata da investigação em alimentos industrializados ainda se verificam poucos trabalhos, sendo que os métodos reportados mostram-se ainda bastante demorados, com etapas de preparo de amostras relativamente onerosas (YU et al., 2017).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou desenvolver e comparar dois métodos cromatográficos relativamente rápidos para a análise do inseticida bifentrina em amostras de alimentos industrializados supostamente contaminados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Desenvolver um método analítico que fosse, a um só tempo, sensível, reprodutível, exato e preciso, para a análise do inseticida bifentrina em amostras de alimentos industrializados.

### 2.2 Específicos

- ✓ Realizar um levantamento de dados da literatura relacionados com o preparo de amostras de alimentos industrializados para análise de resíduos de pesticidas, especialmente do inseticida bifentrina;
- ✓ Testar as condições operacionais para separação e detecção do inseticida bifentrina, seja por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplado a detector de arranjo de fotodiodos (CLAE/DAD) ou por cromatografia a gás acoplada a detector por captura de elétrons (CG/DCE);
- ✓ Realizar testes de procedimentos de extração e *clean up* para preparo das amostras de alimentos industrializados;
- ✓ Desenvolver métodos analíticos baseados nesses procedimentos e técnicas, envolvendo desde o preparo da amostra até a quantificação do composto;
- ✓ Determinar as figuras de mérito dos métodos (seletividade, linearidade, sensibilidade, exatidão e precisão);
- ✓ Selecionar o método considerado mais sensível e aplicá-lo à análise de 22 produtos alimentícios industrializados, provenientes de um supermercado local sob suspeita de contaminação, assim como em algumas de suas respectivas embalagens.



### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

Este capítulo destina-se ao marco histórico dos pesticidas, assim como ao levantamento bibliográfico dos procedimentos de extração e principais técnicas cromatográficas utilizadas para identificação de pesticidas em amostras de alimentos.

#### **3.1 Os Pesticidas e os Inseticidas Piretróides**

O marco histórico da utilização dos pesticidas pela humanidade está atrelado à busca de melhores condições de vida, e o conseqüente aumento da produção e consumo de alimentos. Esse processo teve início por volta de 10 mil anos atrás com o aumento populacional, tornando necessária a estocagem dos produtos alimentícios para prevenir possíveis perdas na agricultura. Os primeiros inseticidas e fungicidas foram identificados a partir de testes, baseados em tentativas e erros, porém a composição química ainda era desconhecida. O primeiro elemento químico utilizado para combater insetos foi o enxofre (S), depois foi obtido o extrato do piretro, a partir de estudos realizados com plantas secas para controle de piolhos. Com isso, a química dos inseticidas foi ganhando espaço e novas sínteses foram surgindo, tornando necessária a classificação quanto ao alvo de ataque, a origem e a toxicidade (BRAIBANTE e ZAPPE, 2012).

Os pesticidas podem ser classificados, com relação ao alvo como acaricidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, nematicidas e rodenticidas. Já quanto à classificação química, podem ser inorgânicos, orgânicos de síntese ou de origem vegetal. Quanto à classificação de risco ou toxicidade a humanos, os pesticidas são diferenciados pelas cores dos rótulos, sendo a cor vermelha destinada aos compostos altamente tóxicos; a amarela às substâncias de nível médio; a azul, quando a toxicidade é baixa, e a verde, quando o composto não apresenta riscos à saúde da população (SAMSIDAR, SIDDIQUEE e SHAARANI, 2018).

É importante frisar a importância da eliminação e substituição paulatina de algum desses compostos, como por exemplo todos os inseticidas organoclorados, bem como alguns inseticidas dos grupos dos organofosforados e dos carbamatos, devido à sua persistência no ambiente e elevada toxicidade a mamíferos. Assim, os piretróides surgiram como uma alternativa a esses

praguicidas, devido à sua rápida degradação no meio, aliada à baixa toxicidade a mamíferos. No entanto, apesar dessas vantagens, os piretróides podem acumular-se em sedimentos, devido à sua alta hidrofobicidade e pseudo resistência. Esse fato vem despertando preocupação em relação aos riscos advindos do contato a longo prazo, tendo em vista que diversos estudos realizados com organismos aquáticos apontaram intoxicação aguda (LI et al., 2017).

É importante destacar também os riscos à saúde humana decorrentes do contato contínuo e por vezes sem o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs), por parte dos manipuladores de formulações das fábricas de agrotóxicos, agricultores que fazem uso desses produtos e dos indivíduos que os utilizam em seus lares para controle de pragas. Tais riscos podem ser avaliados em fontes de possíveis exposição como o ambientes doméstico, lavouras, amostras de urina, poeira, sedimentos e até mesmo em supermercados que contêm produtos alimentícios industrializados, os quais são às vezes submetidos a pulverizações diretamente nas prateleiras (GLORENNEC et al., 2017).

Saillenfait et al (2015), fizeram uma revisão baseada no banco de dados do PubMed, destacando efeitos adversos à saúde dos seres humanos que estiveram em contato com alguns piretróides. Os autores frisaram que a exposição é generalizada, já que tanto crianças quanto adultos são suscetíveis a esses compostos. Os danos à saúde, devido à exposição prolongada, são bem perceptíveis, como parestesia, irritação respiratória, ocular e cutânea. Outro efeito, considerado grave por esses autores é a alteração no DNA do esperma, diminuição dos hormônios reprodutivos e anomalias no desenvolvimento neuro-comportamental no útero, devido aos problemas na gravidez provocados pela exposição da gestante aos piretróides.

Portanto, o uso em grande demanda de piretróides sem as devidas precauções poderá ocasionar danos às populações, bem como às biotas, sejam elas aquáticas ou terrestres. Daí a importância de estudos analíticos que visem determinar o limite máximo permitido em cada cultura, bem como avaliar os ambientes propícios à contaminação.

### 3.1.1 Bifentrina

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o composto bifentrina (Figura 1) pode ser obtido pela síntese orgânica, sendo que sua estrutura química foi primeiramente elucidada a partir da obtenção de extratos vegetais da flor de *crisântemo* (RIAR, 2014). Esse princípio ativo vem sendo utilizado no combate de ácaros, insetos e formigas, sendo considerado moderadamente tóxico os seres humanos e altamente tóxico para indivíduos aquáticos (PENNINGTON et al., 2014). O composto é encontrado na forma de dois isômeros, *cis* e *trans*, porém somente a forma *cis*-bifentrina é disponibilizada comercialmente (WANG et al., 2017).

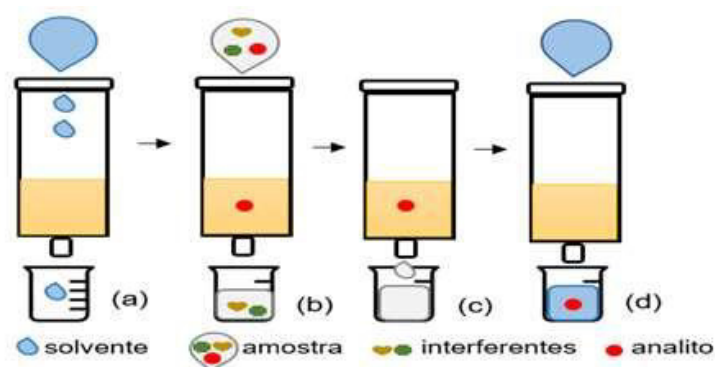
Muitos estudos apontam que o uso indiscriminado desse pesticida pode ocasionar sérios prejuízos ambientais, como a perda da fertilidade dos solos, poluição nos recursos hídricos e efeitos persistentes no ecossistema (PENNINGTON et al., 2014). Diversos pesquisadores vêm realizando testes *in vitro* (SAILLENFAIT, NDIAYE e SABATE, 2016) e *in vivo* (ZHANG et al., 2015) com a bifentrina, a fim de investigar os possíveis danos ao ambiente e à saúde dos seres vivos. Mimbs IV et al (2016), por exemplo, realizaram um estudo em áreas úmidas próximas a campos de cultivos de milho e soja, nos quais era aplicado o inseticida bifentrina. Os autores constataram que 83% das amostras estavam contaminadas e que a concentração não sofria alteração no decorrer dos dias, evidenciando a elevada persistência do composto. Os autores apresentaram ainda dados epidemiológicos que comprovaram os efeitos do pesticida à saúde humana. Danos reprodutivos e alterações comportamentais de indivíduos que consumiam os alimentos à base do trigo (SAVI et al., 2016) e o algodão (MANSOOR et al, 2016) também já foram publicados em estudos analíticos relativos à identificação de bifentrina.

Na atualidade, qualquer organismo está sujeito à contaminação por bifentrina, tendo em vista que esse agrotóxico está liberado para ser utilizado tanto em ambientes fechados (casas, indústrias, supermercados) quanto abertos (lavouras).

### 3.2 Procedimentos Para Preparo de Amostras para Análise de Pesticidas em Alimentos

Os procedimentos de extração visam à retirada do analito da sua matriz e separação deste dos demais componentes da amostra, preservando ao máximo a sua estrutura química e a sua concentração. Quando o analito está presente em níveis traços, faz-se necessária a remoção de interferentes, mediante um minucioso preparo da amostra. Nesse sentido, diversas metodologias vêm sendo desenvolvidas, objetivando a simplificação das etapas e o volume de solventes utilizados. Porém, vários fatores, que incluem as características físico-químicas do analito e da matriz, necessitam ser considerados no momento da escolha do procedimento de preparo de amostra (JARDIM, 2010).

Dentre os procedimentos de extração mais utilizados na análise de pesticidas em matrizes complexas, como por exemplo, matrizes alimentares, destaca-se a extração em fase sólida (EFS, Figura 2). A técnica consiste, inicialmente, na ativação de um material (p. ex., um cartucho) contendo a fase adsorvente, mediante passagem de um solvente. Após acondicionamento, a amostra será eluída no interior do cartucho, momento em que ocorrerá a adsorção do analito nos sítios ativos do sólido. O eluato, contendo os co-extrativos é descartado e faz-se necessária a secagem do adsorvente, que normalmente é feita por passagem de corrente de N<sub>2</sub>. A última etapa é a eluição do(s) analito(s) com um solvente apropriado, que deve ser escolhido de forma a retirar o composto da matriz adsorvente (PENG et al., 2016).



**Figura 2.** Procedimento de extração em fase sólida: (a) acondicionamento do cartucho; (b) percolação da amostra; (c) adsorção do analito e secagem; (d) eluição. Fonte: a autora.

O mecanismo da extração em fase sólida é semelhante ao equilíbrio da cromatografia a líquido em coluna: as moléculas serão extraídas e separadas mediante fenômenos de adsorção, partição, exclusão ou troca iônica. Tais mecanismos ocorrem devido às interações físico-químicas entre a fase estacionária e o analito, podendo ser por ligações de hidrogênio, por dipolo induzido, por dipolo/dipolo ou por interações iônicas. No final do mecanismo, o fator de pré-concentração do analito na amostra será determinada pela razão entre o volume inicial de amostra utilizada pelo volume final obtido após o processo de dessorção (JARDIM, 2010).

Dentre as principais vantagens dessa técnica de extração e pré-concentração, podemos destacar: redução do volume de solventes, aumento da seletividade a partir da concentração do analito, diminuição de interferentes e disponibilidade comercial de materiais. Apesar dessas vantagens, a EFS apresenta algumas limitações, como a utilização de solventes tóxicos que podem causar danos ao ambiente, elevado tempo de análise e alto custo de materiais e equipamentos (*manifolds*).

Beker et al (1989) desenvolveram a extração por dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) com o intuito de otimizar o procedimento analítico realizado na EFS. Esse tipo de extração consiste em homogeneizar a amostra, que poderá encontrar-se em matrizes sólida ou líquida, em um material adsorvente. No caso particular dos pesticidas, o florisil, a sílica e o octadecil vêm sendo utilizados como adsorventes em boa parte das publicações (Tabela 1).

Outra técnica de preparo de amostras muito reportada é a extração por microondas, a qual é realizada através da incidência de radiações eletromagnéticas que situam-se no espectro entre a região do infravermelho e as ondas de rádio. Esta técnica é considerada sofisticada, pois permite a utilização de uma pequena quantidade da amostra e solventes, sendo a extração realizada em um curto intervalo de tempo. Para isto, faz-se necessária a utilização de solventes que dissolvam tanto a amostra quanto o analito, e que sejam capazes de interagir com o campo magnético (WANG et al., 2018).

Tsukui e Rezende (2014) destacam os principais parâmetros físico-químicos envolvidos no processo de extração por microondas como sendo: temperatura, momento de dipolo, estrutura molecular do analito, ligação química, polaridade, constante dielétrica e capacidade calorífica. Esses autores

ressalvam ainda que, no momento em que o campo elétrico interage com a molécula de interesse, ocorre a rotação do dipolo, alinhando-se com o campo elétrico; quando a energia do microondas é cessada, a molécula retorna ao seu estado desordenado e libera a energia na forma de calor para o meio reacional, e para isso é necessário que a molécula possua um momento dipolo.

**Tabela 1.** Trabalhos recentes envolvendo análises de pesticidas em diferentes matrizes, empregando a técnica EFS

<b>Amostra (g)</b>	<b>Adsorvente (g)</b>	<b>Eluente (mL)</b>	<b>Pesticidas</b>	<b>Técnica Analítica</b>	<b>Referência</b>
Água de coco liofilizada	C <sub>18</sub>	Acetonitrila (20 mL)	Lufenuron, bifentrina e teflubenzuron	CLAE/UV	SANTOS et al., 2012
Planta ( <i>Morinda officinalis</i> )	Florisil	Acetona: Hexano	Organoclorados e piretróides	CG/DCE e CG/EM	LIU et al.; 2015
Ovos liofilizados	Florisil	Acetonitrila	Atrazina, lindano, bifentrina, deltametrina, permetrina, cipermetrina, etion	CG/EM	SOUZA et al., 2013
Flor utilizada para chás ( <i>Flos Chrysanthemi</i> )	Alumina neutra-Florisil	Acetato de etila: hexano (15:85)	Organoclorados e piretróides	CG/DCE	HUANG et al., 2014
Sementes de uva	C <sub>18</sub> , carbono grafitado preto, óxido de zircônio, amina secundária	Acetato de etila	130 pesticidas de diferentes classes e polaridades	CG/EM	GARCIA, GONZALEZ e FRENICH, 2015
Abelhas	C <sub>18</sub> e Florisil	Acetonitrila	153 pesticidas de diferentes classes e polaridades	CG-NPD/DCE	ŁOZOWICKA, 2013

EFS = Extração em fase sólida; CLAE/UV = Cromatografo a líquido equipado com detector ultravioleta ;CG/DCE = Cromatografo a gás equipado com detector por captura de elétrons; CG/EM = Cromatografo a gás equipado com detector por espectrometria de massa; CG-NPD/DCE = Cromatógrafo a gás equipado com detector por captura de elétrons e de nitrogênio. Fonte: a autora.

### 3.3 Determinação de Pesticidas em Alimentos

Atualmente existem mais de 1.300 pesticidas utilizados em atividades voltadas à agricultura. Nesse sentido, faz-se necessário averiguar as normas regulamentadoras estabelecidas pelas agências de registros e determinar a quantidade dos princípios ativos presentes nas formulações dos pesticidas. As análises de rotina desses compostos para o controle de qualidade geralmente são baseadas em métodos analíticos precisos e confiáveis (PLONKA, WARLORCZY e MISZCZYK, 2016).

O Conselho Internacional Colaborativo para Análise de Pesticida (do inglês, *Collaborative International Pesticides Analytical Council*, CIPAC) e a Associação Internacional Oficial de Química Analítica (do inglês, *Association of Official Analytical Chemistry International*, AOAC) são organizações que mais têm publicado métodos oficiais para análise de pesticidas. Tais métodos são reconhecidos internacionalmente, sendo essenciais às análises de rotina, não só em laboratórios de pesquisa, como também nos laboratórios acreditados para análises de controle e monitoramento.

Os métodos validados por essas organizações focam, em sua grande maioria, em apenas um ingrediente ativo, e utilizam, portanto, instrumentações e solventes específicos para cada substância; porém, muitos métodos multirresíduos também têm sido considerados oficiais (PLONKA, WARLORCZY e MISZCZYK, 2016).

É importante destacar que, apesar do quantitativo de métodos cromatográficos disponíveis na literatura ter aumentado gradativamente nos últimos anos, alguns desses métodos encontram-se ultrapassados, devido sobretudo à utilização de grande volume de solventes. Por outro lado, os métodos mais recentes publicados por essas agências fazem uso de detectores caros e que necessitam de estrutura e treinamento adequados para sua utilização, bem como recursos financeiros para sua manutenção. É por isso que, apesar do grande número de métodos oficiais divulgados, é importante que os laboratórios busquem desenvolver métodos internos mais acessíveis e menos onerosos.

As metodologias mais recentes descritas para determinação de piretróides em alimentos utilizam em sua grande maioria solvente apolar. A

IUPAC (2008) disponibilizou em seu banco de dados os valores da solubilidade em água e o  $\log K_{ow}$  (-20°C) de alguns pesticidas que são utilizados na proteção de alimentos processados contra insetos. A Tabela 2 seleciona alguns dos piretróides mais usados.

**Tabela 2.** Características físico-químicas dos inseticidas piretróides comumente empregados para proteção de alimentos industrializados

<b>Piretróide</b>	<b>Solubilidade em água (mg/L, 20°C)</b>	<b>Log <math>K_{ow}</math>-20°C</b>
Bifentrina	0,001	7,30
Permetrina	0,2	6,10
Aletrina	2	4,96
Cipermetrina	-	5,89
Deltramina	0,002	6,20

Adaptado da fonte: IUPAC, 2008

Em geral, os piretróides apresentam baixa solubilidade em água e valores consideravelmente altos de  $\log K_{ow}$ , o que indica a propensão desses compostos a se depositarem nos tecidos gordurosos, causando a bioacumulação ao longo da cadeia trófica (PENNINGTON et al., 2014). Esse caráter lipofílico também representa um risco à saúde humana, já que sua eliminação do organismo pode ser muito lenta e a presença desses compostos pode levar ao desenvolvimento de várias doenças neurológicas, danos no DNA, além de outras complicações crônicas (SAILLENFAIT, NDIAYE e SABATÉ, 2015).

Do ponto de vista da análise química, a lipofilicidade dos piretróides pode ser vantajosa, quando se trata da extração desses pesticidas com solvente apolar em matrizes ricas em umidade; a água contida nesses substratos beneficiará a extração do meio lipofílico para o aquoso, aumentando assim, a eficácia do procedimento de extração. Os solventes mais utilizados para extração desses compostos em alimentos têm sido hexano, diclorometano e éter de petróleo (TEWARY et al., 2005). As etapas de extração têm sido realizadas a partir de procedimentos analíticos, que vão das mais simples, como a partição líquido-líquido (PETRARCA et al., 2017) até as mais sofisticadas, como a extração assistida por microondas (WANG et al., 2018).



Ainda são poucos os trabalhos publicados com o objetivo de desenvolver métodos para a análise de resíduos do inseticida bifentrina em alimentos industrializados, e isso se deve principalmente à dificuldade em se realizar as etapas inerentes ao preparo da amostra. A Tabela 3 apresenta, resumidamente, algumas informações acerca dos principais métodos encontrados para análise desse composto em diversos tipos de alimentos.

**Tabela 3.** Métodos mais recentes, publicados na literatura, para determinação de bifentrina em alimentos *in natura* e industrializados

Matriz	Preparo de Amostra	Técnica Analítica	Referência
Alimentos industrializados: comidas para bebês	Microextração líquido-líquido assistida por ultrassom, usando acetonitrila (ACN) em presença de ácido acético (HAc), seguida de aplicação de ultrassom, partição em CHCl <sub>3</sub> , rotaevaporação e retomada do resíduo com metanol (MeOH)	CLAE-EM/EM	PETRARC A et al., 2017
Alimentos industrializados: comidas para bebês	Extração por partição líquido-líquido (PLL) com ACN, em presença de NaCl	CLAE-EM/EM	PETRARC A et al., 2017
Alimento <i>in natura</i> : ovos de galinha	Microextração em fase sólida, seguida de EFS sequencial em Florisil e C <sub>18</sub> , eluição com ACN, evaporação com fluxo de N <sub>2</sub> e ressuspensão em acetato de etila (EtAc).	CG/EM	PARENTE et al., 2017
Polpas de frutas industrializadas	Extração assistida por microondas (EAM) com etanol, PLL em presença de H <sub>2</sub> O e clorobenzeno, ultrassonificação, centrifugação, evaporação com N <sub>2</sub> , ressuspensão em MeOH	CLAE/UV ( $\lambda = 220\text{nm}$ )	WANG et al., 2018
Óleos industrializados (soja, canola, girassol, milho e azeite de oliva virgem)	Extração com ACN em vórtex, centrifugação, diluição do sobrenadante com H <sub>2</sub> O, agitação por nanopartículas magnéticas revestidas de poliestireno, em presença de ACN/HAc, agitação em vórtex, evaporação com N <sub>2</sub> e ressuspensão em ACN.	CLAE/DAD ( $\lambda = 220\text{nm}$ )	YU et al., 2017
Pêssego (suco <i>in natura</i> , polpa e casca do fruto)	Liofilização em presença de acetona, EAM, retomada do extrato e adição de H <sub>2</sub> O + dodecan-1-ol, ultrassom, centrifugação, diluição em MeOH e dodecan-1-ol	CG/DCE	MASTSADI Q et al., 2011

Alimentos industrializados: batata frita, batata cozida e arroz polido. Produto <i>in natura</i> : rabanete coreano	Extração com ACN/HAc, agitação em presença de NaAc e MgSO <sub>4</sub> , centrifugação, adição de MgSO <sub>4</sub> e amina ao sobrenadante, nova centrifugação, retomada do sobrenadante, evaporação e ressuspensão com n-hexano/acetona.	GC/ μDCE	PARK et al., 2011
Chás variados	Extração com CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , filtração em papel de filtro contendo Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anidro, <i>clean-up</i> por EFS em coluna de florisil-sílica acondicionada com hexano, eluição com hexano e depois com hexano/DCM.	CG/DCE	TEWARY et al., 2005

EFS = Extração em fase sólida; CLAE/EM/EM = Cromatógrafo líquido equipado com detector por espectrometria de massas CG/EM = Cromatógrafo a gás equipado com detector por espectrometria de massas; CLAE/UV = Cromatógrafo a líquido equipado com detector ultravioleta; CLAE/DAD = Cromatógrafo a líquido equipado com detector por rede de fotodiodos; GC/DCE = Cromatógrafo a gás equipado com detector por captura de elétrons; GC/Mdce = Cromatógrafo a gás equipado com microdetector de captura de elétrons. Fonte: a autora

A Tabela 3 destaca a aplicação de diversas metodologias para análise de bifentrina em alimentos *in natura* e processados, com ênfase na utilização de técnicas cromatográficas, por serem estas capazes de identificar com alto nível de confiança, resíduos desse composto. Destaca-se, aqui, a importância da realização de novos testes com propostas inovadoras com procedimentos de extração rápido, barato e eficaz, como a metodologia utilizada pelos autores WANG et al. (2018).

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado em três laboratórios. A determinação de lipídeos foi realizada no Laboratório de Análises e Pesquisas de Alimentos, Bebidas e Ambiental – APAA no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão *Campus* Monte Castelo. A otimização do método e o desenvolvimento para análise de bifentrina por cromatografia a líquido foi realizado no Laboratório do Núcleo de Biodiesel. A análise do teor de umidade e a otimização do método por cromatografia a gás foi realizada no Laboratório do Núcleo de Análise de Resíduos de Pesticidas (NARP), ambos localizados no Centro de Ciências Exatas e Tecnologia na Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

#### **4.1 Soluções, Reagentes e Demais Materiais**

Cis-bifentrina em acetonitrila (pureza 98%, Sigma-Aldrich); acetonitrila grau HPLC (99,9%, Merck); hexano (98%, Merck); éter de petróleo (Merck). Os materiais usados foram: filtro millex®, com diâmetro de poro de 0,22µm (Millipore); papel de filtro qualitativo Nalgon (80g/m<sup>2</sup>); adsorventes Florisil® partículas de 60-100 mesh, sílica e sulfato de sódio (todos da Merck), béquer (5 e 10mL); proveta (10 mL), balão de fundo de chato (5 e 10mL).

#### **4.2 Equipamentos e Acessórios**

Para as análises cromatográficas, foram utilizados os seguintes sistemas: 1) cromatógrafo a líquido equipado com detector de arranjo de fotodiodos, CLAE/DAD (Shimadzu, Kyoto, Japão), incluindo os seguintes módulos: injetor manual (modelo LC-20AD), bomba (modelo CBM-20A), forno da coluna (modelo CTD-20A), e coluna C<sub>18</sub> (15cm de comprimento; 4,6mm de diâmetro e 5µm de espessura, da Shimadzu); 2) cromatógrafo a gás equipado com detector de captura de elétrons, CG/DCE, com emissão de <sup>63</sup>Ni (Shimadzu, Kyoto, Japão), composto dos seguintes módulos: Auto Injetor (modelo AOC-20i), forno da coluna (modelo GC-2010 Plus) e coluna capilar Rtx®-5 com as seguintes dimensões 30m de comprimento; 0,25mm de diâmetro e 0,25µm de espessura (Restek, Bellefonte, USA).

A extração assistida por forno microondas, foi realizada no forno CEM, Modelo Mars 6 X-Press 230/60 (CEM Company, USA). Para a realização das análises de umidade e lipídeos foram utilizados os seguintes equipamentos: extrator de soxleht (Ethiktechnology, modelo 211/3, Curitiba, PR); evaporador rotativo (Fisatom, modelo 802, São Paulo, SP); estufa com controle de temperatura e tempo (DeLeo, modelo DL-AF, Curitiba, PR); banho ultrassônico (Quimis, modelo Q3350, São Paulo, SP) e balança analítica (Quimis, Q500B210C, São Paulo-Brasil).

#### **4.3 Amostragem**

As amostras dos alimentos foram coletadas em um supermercado de São Luís, MA, que na ocasião dessa pesquisa encontrava-se sob intervenção da

Vigilância Sanitária Municipal, em razão de haver suspeita de contaminação de parte dos alimentos industrializados pelo inseticida bifentrina. A Vigilância Municipal procedeu à coleta das amostras no dia 09 de novembro de 2016, tendo sido estas encaminhadas ao laboratório do Núcleo de Análise de Resíduos de Pesticidas, NARP/UFMA, onde foram congeladas em uma temperatura de aproximadamente 8°C e analisadas posteriormente, após a otimização do método analítico.

#### **4.4 Análises dos Alimentos**

Inicialmente, foram determinados os teores de umidade e lipídeos em duas amostras de alimentos (biscoito *wafer diet* sabor chocolate e extrato de tomate), sendo estas utilizadas no processo de otimização dos métodos cromatográficos. A metodologia utilizada foi adaptada do Manual de Métodos Físico-Químicos do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005).

##### *4.4.1 Determinação da umidade*

A determinação do percentual de umidade foi realizada conforme o Instituto Adolfo Lutz (IAL,2005). Foi pesada uma massa de 2g da amostra diretamente em um cadinho de porcelana previamente seco, resfriado em dessecador e pesado. Os cadinhos contendo as amostras foram aquecidos em estufa, por 24h e, novamente, resfriados em dessecador à temperatura ambiente, para posterior pesagem e determinação da percentagem da umidade.

##### *4.4.2 Determinação de lipídeos*

A análise para determinação do teor de lipídeos (IAL, 2005) foi realizada a partir de pesagem de 3g de amostra, sendo esta transferida para um cartucho, preparado com papel de filtro qualitativo. O cartucho contendo a amostra foi inserido em um balão de fundo chato, sendo este acoplado ao extrator Soxleht. O sistema foi mantido sob refluxo contínuo a 45°C com hexano durante 6h. Após o procedimento de extração, o solvente foi evaporado a

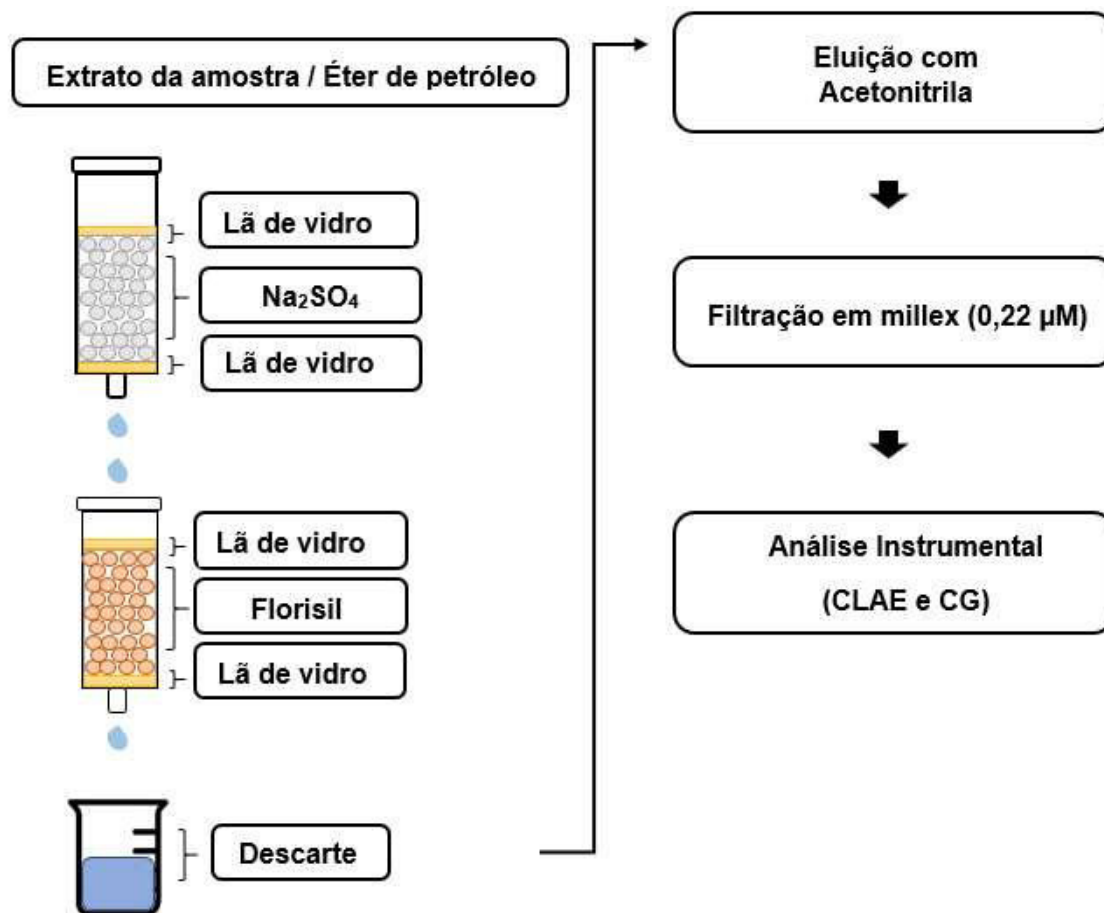
aproximadamente 60°C em um evaporador rotativo. Em seguida, o balão contendo o produto extraído foi aquecido em estufa a 90°C, para remoção dos resíduos de hexano e água, tendo sido, por fim, resfriado em dessecador e pesado, para posterior determinação da percentagem em peso de lipídeos.

#### 4.5 Preparo dos Extratos

Inicialmente, procedeu-se à pré-digestão de cada alimento, misturando-se 2g da amostra com 10mL de éter de petróleo nos próprios tubos utilizados nas extrações por microondas. A pré-digestão deu-se por contato da amostra com o solvente, por 10min à temperatura ambiente, em capela de exaustão. Em seguida, o pré-digerido foi submetido à extração em forno microondas, de acordo com o método *Food*, que se encontra no rol de métodos da biblioteca do equipamento MARS (X-Press). Foram empregadas as seguintes condições operacionais: rampa de pressão de 1030 a 1080W; rampa de temperatura de 25°C a 210°C; rampa de tempo de 0 a 20 min (3 ciclos); tempo para resfriamento de 15 min; potência de 230 V; frequência de 60Hz.

Após a digestão, procedeu-se à etapa de limpeza (*clean up*) dos extratos brutos. Para isso, foram preparadas colunas de Florisil® e sulfato de sódio®. Os adsorventes foram previamente ativados, sequencialmente, a 675°C/2h em forno mufla e depois a 105°C/2h em estufa. A coluna de adsorção foi preparada mediante preenchimento de uma seringa descartável de polipropileno (10 mL de capacidade) contendo 3g do adsorvente. Na base e no topo da seringa, foram colocados pequenos chumaços de lã de vidro, de forma a evitar a perda dos adsorventes durante a passagem dos extratos e eluição dos compostos.

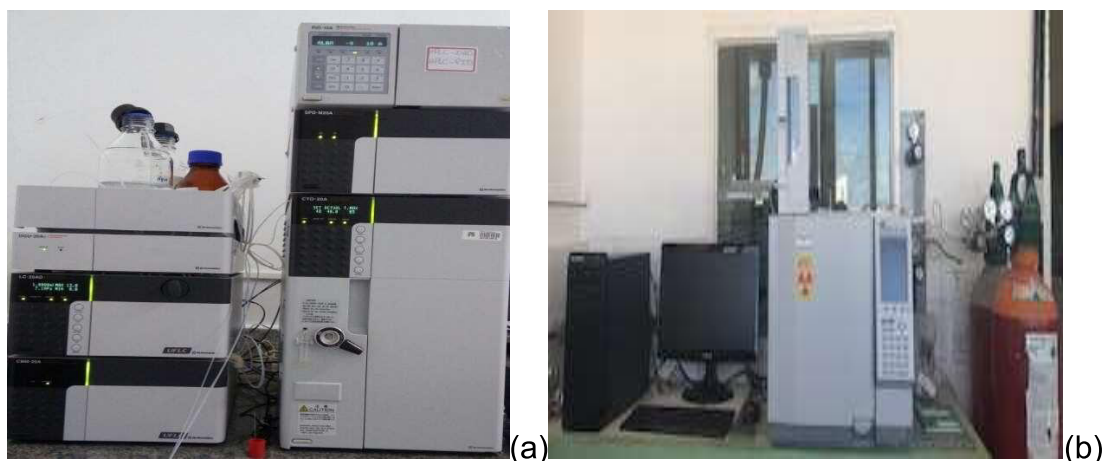
O extrato bruto foi primeiramente eluído na coluna de sulfato de sódio, tendo passado, na sequência, pela coluna de Florisil®. Logo após, foram adicionados 2mL de acetonitrila para auxiliar na segunda eluição. Após a limpeza, o extrato final foi recolhido e filtrado em filtro Millex®. A Figura 3 ilustra o procedimento de *clean up* empregado.



**Figura 3.** Procedimento de purificação (*clean up*) dos extratos de alimentos industrializados para fins de análise do inseticida bifentrina. Fonte: a autora

#### 4.6 Otimização dos Métodos

A etapa de otimização do método analítico envolveu alguns testes de separação utilizando os sistemas cromatográficos CLAE/DAD (Figura 4a) e CG-DCE (Figura 4b). Para cada método, foram determinadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade, sensibilidade (mediante cálculo dos limites de detecção, LD, e de quantificação, LQ), precisão (por determinação dos coeficientes de variação, CV) e exatidão (mediante obtenção dos índices de recuperação).



**Figura 4.** Sistemas cromatográficos-(a)Cromatógrafo a líquido equipado com detector de arranjo de fotodiodos; (b) Cromatógrafo a gás equipado com detector de captura de elétrons. Fonte: a autora.

#### 4.6.1 Seletividade

O estudo da seletividade foi realizado a partir de injeções individuais do padrão analítico e das amostras-testemunhas de extrato de tomate e biscoito *wafer*, a fim de identificar a capacidade do detector em medir o sinal do inseticida bifentrina.

#### 4.6.2 Linearidade

Inicialmente, foi realizado o preparo da solução-estoque do pesticida bifentrina com concentração de  $10\mu\text{g/L}$ , a partir da diluição do padrão analítico de concentração  $95\mu\text{g/L}$  (Sigma Aldrich). Em seguida, foi preparada a solução de trabalho (conc. de  $5\mu\text{g/L}$ ) e, a partir de diluições sucessivas desta, foi construída a curva analítica com seis pontos de concentrações. O intervalo de concentração por CLAE/DAD foi de  $0,5$  a  $5\mu\text{g/L}$  e por CG/DCE foi de  $0,125$  a  $2,5\mu\text{g/L}$ . Cada solução da curva foi injetada no sistema cromatográfico em triplicata, tendo sido então plotados os valores de área em um gráfico concentração *versus* média das áreas.

A partir da curva analítica, foi determinada a faixa linear de trabalho (linearidade) do método e obtido o coeficiente de regressão linear ( $R^2$ ).

#### 4.6.3 Sensibilidade

A sensibilidade do método foi determinada com base nos cálculos dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), a partir da curva analítica, utilizando as expressões abaixo:

$$LD = \frac{3,3 \times S}{\alpha}$$

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

Onde S e  $\alpha$  são, respectivamente, o desvio padrão e coeficiente angular da curva de calibração (POOLE, 2015).

#### 4.6.4 Exatidão

As amostras de alimentos tomadas para a realização dos ensaios de fortificação foram o extrato de tomate e o biscoito *wafer*, 2g de cada amostra foi fortificada com bifentrina, até concentração de 2 $\mu$ g/kg, procedendo-se em seguida à condução das análises do pesticida, empregando o procedimento de extração otimizado, e a detecção e quantificação final do extrato mediante uso das duas técnicas cromatográficas. A exatidão de cada método foi expressa a partir da equação abaixo.

$$Exatidão = \left( \frac{Concentração\ experimental}{Concentração\ teórica} \right) \times 100$$

#### 4.6.5 Precisão

A precisão foi determinada a partir do cálculo do desvio padrão relativo (ou coeficiente de variação, CV%) de cada média (n = 2) proveniente da análise dos alimentos utilizados no estudo de fortificação.

### 4.7 Análise Estatística para Comparação dos Métodos

A eficiência dos métodos foi determinada por comparação dos índices de recuperação, empregando o teste t de *Student* não pareado, em um nível de



95% de probabilidade, tendo sido o delineamento inteiramente casualizado.

#### 4.8 Análises das Amostras de Alimentos

Foram analisados, empregando-se o método que apresentou melhor eficiência, vinte e dois tipos de alimentos industrializados, com características bastante variadas sob suspeita de contaminação (Tabela 4).

**Tabela 4.** Alimentos industrializados tomados para análise pelo método otimizado no presente estudo

Nº	Amostra
1	Almondegas ao molho
2	Café torrado
3	Molho de pimenta (*)
4	Sardinha com óleo
5	Azeitonas verdes
6	Molho de soja Shoyu
7	Goiabada
8	Café Gourmet Coffee Sul de Minas
9	Arroz Sasanishiki(*)
10	Macarrão do tipo espaguete (*)
11	Massa de sêmola de trigo (*)
12	Molho de Tomate Bolonhesa
13	Massa de sêmola spaghetti(*)
14	Cookies integral limão
15	Wafer Caramelo Toffee
16	Extrato de Tomate
17	Azeitonas pretas desencaroçadas(*)
18	Goiabada
19	Paté de Pimenta
20	Massa de sêmola de trigo
21	Cajuada cristalizada
22	Biscoito Wafer Diet

\* alimentos que tiveram suas embalagens posteriormente analisadas. Coletas realizadas no supermercado diretamente por técnicas da Vigilância Sanitária Municipal (São Luís, MA).

Fonte: a autora.

As análises das amostras seguiram o procedimento de preparo descrito no item 4.5. Os extratos finais foram injetados nos dois sistemas cromatográficos (CG/ECD e CLAE/DAD) e as análises da bifentrina, determinadas conforme condições operacionais e instrumentais descritos nos itens 4.2. Também foram analisadas as embalagens dos alimentos identificadas por números 3, 9, 10, 11, 13 e 17.

## 5 RESULTADO E DISCUSSÕES

Os resultados foram divididos em sub-tópicos, iniciando-se com os testes de caracterização físico-química e finalizando com a otimização dos métodos cromatográficos.

### 5.1 Análises dos Alimentos

Antes de iniciar o desenvolvimento do método cromatográfico para análise da bifentrina, uma caracterização físico-química foi realizada com dois alimentos bem distintos, a fim de determinar os percentuais de umidade e lipídeos nas amostras. Com isso, foi possível desenvolver um método de extração que fosse capaz de diminuir o efeito de matriz e um índice de recuperação mais elevado.

#### 5.1.1 Teor de Umidade e Lipídeos

Na Tabela 5, têm-se os teores de umidade e lipídeos das amostras previamente selecionadas para a etapa de otimização.

**Tabela 5.** Produtos tomados como representativos dos grupos de alimentos ricos ou pobres em umidade e lipídeos

<b>Amostras</b>	<b>Umidade</b>	<b>Lipídeos</b>
Extrato de tomate	87,71 (0,21)	0,24 (0,12)
Biscoito <i>wafer</i>	17,52 (0,04)	28,55 (0,39)

Fonte: a autora

Os resultados comprovaram a representatividade das amostras, já que o biscoito apresentou-se como uma matriz rica em lipídeos e pobre em

umidade, enquanto que o extrato de tomate possuía baixo teor de gordura, porém elevada percentagem de água. Segundo López-Blanco et al (2016), a determinação de resíduos de pesticidas em matriz com teor de gordura acima de 10% ainda é considerada um desafio, tendo em vista que muitos lipídeos podem ser co-extraídos no processo de tratamento da amostra e assim dificultar a análise cromatográfica.

Nesse sentido, fez-se necessário a aplicação de um método de extração com possibilidade de extrair a bifentrina de uma ampla variedade de matrizes de alimentos, que contivessem componentes de diferentes polaridades. Também, o método necessitava apresentar uma adequada sensibilidade e repetibilidade, mesmo em níveis muito baixos de concentração do analito (LÓPEZ-BLANCO-et al., 2016). Segundo Jardim et al (2010), o procedimento EFS tem sido bastante utilizado pelos cromatografistas em análise de rotina nesses tipos de matrizes, apresentando ainda a vantagem de pré-concentrar os extratos, atingindo os limites de detecção instrumentais.

## **5.2 Extração Assistida por Microondas**

O procedimento de extração empregado, baseado na radiação por microondas, concordou com os princípios da Química Verde, já que tem como perspectivas a redução do volume do solvente extrator, assim como a diminuição do tempo de análise e a redução da geração de resíduos (TSUKUI e REZENDE, 2014).

O uso de solventes apolares, como o éter de petróleo, em geral resulta no aparecimento de substâncias co-extraídas também apolares que, por sua vez, podem interferir na análise cromatográfica, mas a quantidade de moléculas polares nessas matrizes costuma ser ainda maior, sobretudo se o teor de água no alimento é elevado, e com o solvente apolar estas não são extraídas conjuntamente (PANDEY e SHRIVASTAVA, 2017; LI et al., 2012). No presente trabalho, as amostras de alimentos industrializados com alto teor de umidade possibilitaram maior eficiência no processo de extração. A água aumentou a polaridade do meio reacional, aumentando a eficiência do processo de extração com o solvente orgânico. Wu et al (2015) fizeram uso dessa estratégia, ao extrair pesticidas organofosforados de amostras de legumes frescos ricos em água

empregando radiação microondas, tendo utilizado hexano como extrator.

Nesse trabalho, a utilização de tubos de teflon pressurizados proporcionou o controle do *extress* térmico e da pressão, reduzindo, assim, a possibilidade de perda do analito e de substâncias voláteis presentes na matriz (PANDEY e SHRIVASTAVA, 2017). O volume do solvente extrator (éter de petróleo) foi suficiente para extrair a bifentrina da matriz alimentícia, sem causar aumento de pressão no sistema e sem provocar saturação nos tubos de teflon. Wang et al (2018) realizaram o estudo da quantidade de solvente utilizada durante a realização da extração assistida por forno microondas e observaram que um volume elevado do solvente poderia causarum superaquecimento do meio e conseqüente instabilidade dos componentes do extrato, resultando em repetibilidade e recuperação muito baixas.

### 5.3 Otimização do Método por CLAE/DAD

A otimização do método empregando cromatografia a líquido foi iniciada a partir de testes prévios realizados com sucessivas injeções do padrão de bifentrina, a fim de identificar as condições instrumentais iniciais. Em função da polaridade do analito ser mediana, selecionou-se uma coluna de fase reversa com o intuito de desenvolver um método eficiente e mais rápido (MATTREY et al., 2017). A Tabela 6 apresenta as condições operacionais otimizadas para a separação cromatográfica baseado na técnica por CLAE/DAD.

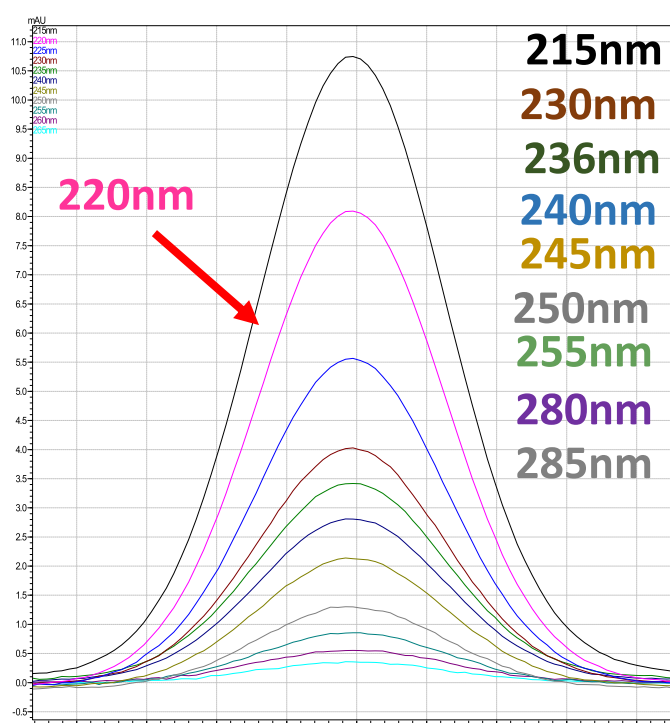
**Tabela 6.** Condições otimizadas para a separação cromatográfica do inseticida bifentrina - técnica CLAE/DAD

Parâmetros	Condições
Fase Móvel	Isocrática: 20% de acetonitrila e 80% de água
Fase Estacionária	C <sub>18</sub>
Vazão da fase móvel	1,0 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Tempo total de corrida	~16 min
Detecção	DAD ( $\lambda = 220\text{nm}$ )
Pressão	3.9 MPa

Fonte: a autora

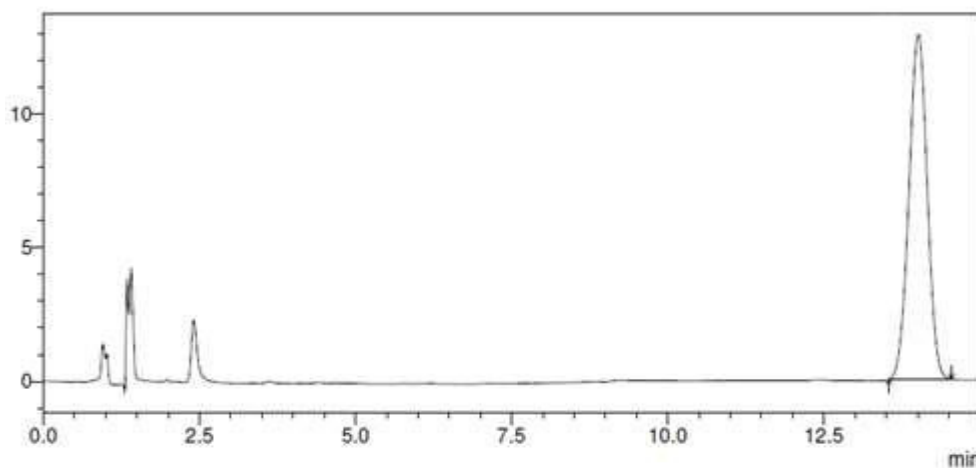
Posteriormente, foi determinado o comprimento de onda de maior absorção do analito (Figura 5). Observou-se que melhor absorção e,

consequentemente, melhor sensibilidade instrumental, foi observada a 200nm; porém, como vários grupos cromóforos provenientes porventura dos compostos co-extraídos como, por exemplo, o  $-NO_2$  podem estar presentes e absorvem nesse comprimento de onda (LANÇAS, 2016), optou-se por trabalhar em valor de  $\lambda=220$  nm. Silvério et al (2012), utilizaram o mesmo comprimento de onda, ao analisar inseticidas piretróides em amostras de água. WANG et al (2018), por sua vez, identificaram o pico cromatográfico da bifentrina no mesmo comprimento de onda, ao realizar análises em polpas de frutas. YU et al (2017), também detectaram a bifentrina na mesma faixa do UV, em amostras de óleos vegetais.



**Figura 5.** Picos cromatográficos do padrão do inseticida bifentrina: sensibilidade instrumental em diferentes comprimentos de onda. Fonte: a autora

Com relação à seleção da fase móvel (FM) no presente estudo a melhor eluição do composto ocorreu no modo isocrático, com FM constituída da mistura água/acetonitrila (20:80). O melhor fluxo foi de 1mL/min, o qual possibilitou a saída do pico cromatográfico em um tempo de retenção de aproximadamente 14min (Figura 6).



**Figura 6.** Cromatograma do padrão de bifentrina após otimização de separação por CLAE/DAD. Concentração da solução: 1,5 mg/L. Fonte: a autora.

Como as amostras de alimentos costumam ser complexas e, em geral, o processo de extração arrasta muitos compostos que normalmente são eluídos em tempos de até 10min aproximadamente, o tempo de retenção do analito de ~14 min mostrou-se adequado para a quantificação do analito, sem nenhuma sobreposição com picos dos co-extrativos e, portanto, sem interferência por parte dos componentes da matriz.

#### **5.4 Otimização da Separação por CG/DCE**

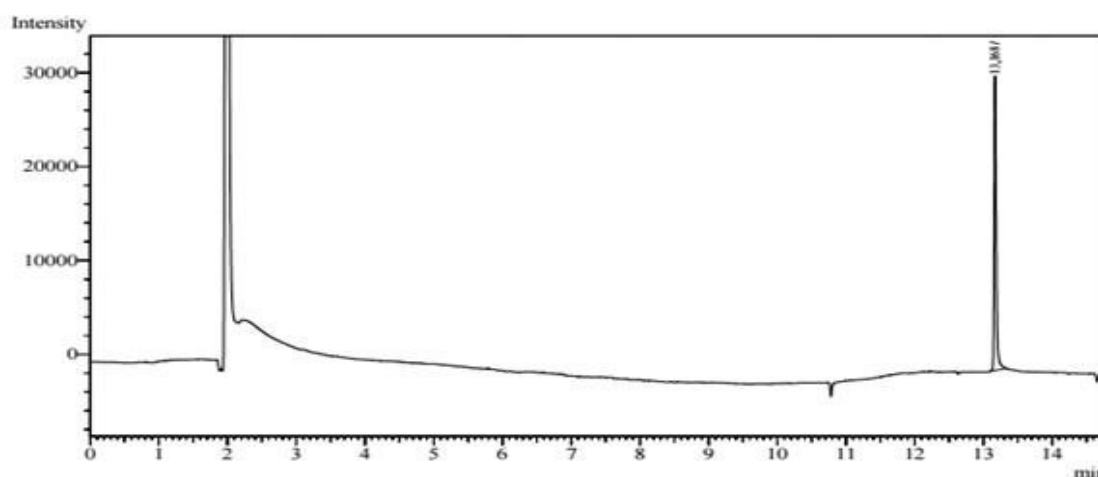
Como no caso anterior, a otimização deu-se a partir de testes prévios, tomando-se, como ponto de partida, métodos já descritos na literatura para análise desse e de outros piretróides em alimentos (SLOWIK-BOROWIEC, SZPYRKA e WALORCZYK, 2015; LIU et al., 2015; FREITAS et al., 2014; MIAO et al., 2013). A Tabela 7 fornece as condições operacionais e instrumentais otimizadas para a separação por CG/DCE.

**Tabela 7.** Condições otimizadas para a separação cromatográfica do inseticida bifentrina - técnica CG/DCE

Fase Móvel	Hélio
Vazão da fase móvel	50 mL/min
Fase Estacionária	DB-S (30m; 0,25 $\mu$ m; 0,25mm)
Volume de injeção	10 $\mu$ L
Tempo Split	5 min
Detecção	DCE
Programação de Temperatura	80°C/2 min., com rampa de aquecimento de 25°C/min até 300°C, essa temperatura foi mantida durante 15 min. Logo em seguida estabilizou-se a temperatura com rampa de resfriamento de 25°C/min até 50°C durante 5 min.

Fonte: a autora.

Nas condições apresentadas na Tab. 7, foi possível eluir o pico do composto no tempo de retenção,  $t_R$ , de ~13,17 min (Figura 7). Assim como no caso anterior, os cromatogramas das amostras apresentaram-se livres de interferentes ou compostos co-eluídos próximos a esse  $t_R$ . O aparecimento de picos de compostos co-extraídos das matrizes (amostras dos alimentos industrializados), em tempos inferiores ao  $t_R$  da bifentrina, pode ser visto nos cromatogramas apresentados nos anexos 2 e 3, relativos às análises das amostras empregando o método por CG/DCE.



**Figura 7.** Cromatograma do padrão de bifentrina, após otimização da separação por CG/DCE. Concentração da bifentrina = 1,5 $\mu$ g/L. Fonte: a autora.

A técnica CG/DCE vem sendo bastante utilizada para determinação desse inseticida piretróide em amostras complexas, tais como suco de pêssego (MASTSADIQ et al., 2011), batata frita e arroz polido (PARK et al., 2011), amostras de chás (TEWARY et al., 2005), entre outros. Em tais trabalhos, foram empregadas condições cromatográficas semelhantes às utilizadas na presente pesquisa, como o gás de arraste e a coluna capilar, apresentando apenas pequenas alterações na rampa de aquecimento, que foi adaptada de acordo com as características das matrizes alimentícias investigadas.

## 5.5 Comparação das Figuras de Mérito

### 5.5.1 Linearidade

Dados das curvas analíticas obtidas com as duas técnicas encontram-se na Tabela 8 e a Figura 8 apresenta as curvas de calibração. A curva analítica foi construída mediante injeções de soluções do padrão de bifentrina, em concentrações crescentes. A linearidade foi comparada a partir dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos a dessas curvas. O valor de  $R^2$  expressa o quanto a área dos picos e as concentrações injetadas estão linearmente correlacionadas. A faixa de trabalho, por sua vez, evidencia a maior ou menor aplicabilidade da técnica. Em ambos os casos, as faixas lineares de trabalho mostraram-se adequados para análise de resíduos. Além disso, ambos os métodos analíticos apresentaram valores de  $R^2$  bem acima do nível mínimo aceitável, tanto para ANVISA ( $R^2=0,99$ ) (ANVISA, 2004), quanto para o INMETRO ( $R^2=0,90$ ) (INMETRO, 2003).

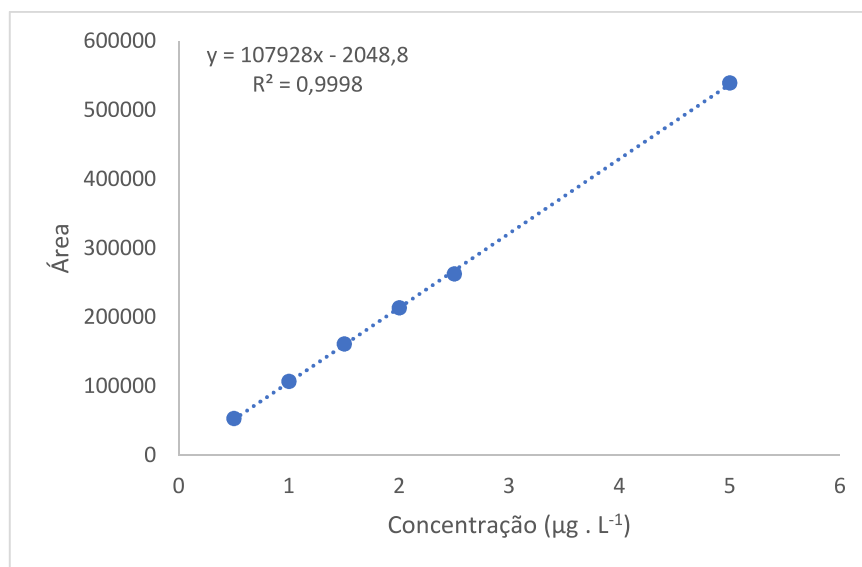
**Tabela 8.** Dados das curvas de calibração para o inseticida bifentrina, obtidos com as duas técnicas cromatográficas

<b>Área versus concentração - CLAE/DAD</b>				
<b>Concentração (<math>\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}</math>)</b>	<b>Área 1</b>	<b>Área 2</b>	<b>Área 3</b>	<b>Média</b>
0,5	52752	53276	52950	52993
1	107015	106815	106796	106875
1,5	161187	160850	161587	161208
2	212514	213764	213830	213369
2,5	263726	262130	262690	262849
5	529712	544941	543872	539508

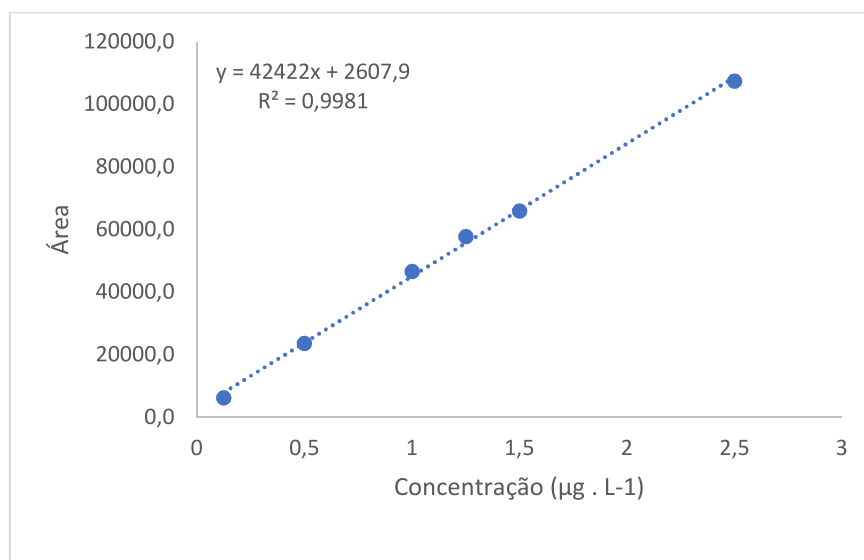


Área versus concentração - CG/DCE				
0,125	6152,1	6167,4	6210,1	6176,5
0,5	24407,6	228331,2	23541,2	9209,3
1	46866,7	46731,6	46197,7	46598,7
1,25	56470,6	58126,2	58596,9	57731,2
1,5	68344,2	64949,2	64227,8	65840,4
2,5	108017,4	105840,4	108226,8	107361,5

Fonte: a autora.



(a)



(b)

**Figura 8.** Curvas de calibração obtidas mediante as técnicas por CLAE/DAD (a) e CG/DCE (b). Fonte: a autora.

Também, observando-se as faixas lineares obtidas para as duas técnicas percebeu-se que o método explorado por CLAE/DAD pode ser empregado para análises de amostras mais concentradas, como por exemplo, em trabalhos envolvendo determinação de pureza de produtos comerciais à base do inseticida bifentrina. A técnica por CG/DCE, por sua vez, é adequada não só para esse fim, mas também para análise de nível de traços já que a faixa linear é bastante baixa.

### 5.5.2 Seletividade

As técnicas utilizadas foram consideradas seletivas, pois não apresentaram interferentes no tempo de retenção da bifentrina. Algumas estratégias de confirmação de picos têm sido bastante exploradas em análises cromatográficas, destacando-se, por exemplo, a possibilidade de verificação da pureza de picos pelo detector por arranjos de fotodiodos (DAD). Este detector permite realizar a varredura em diferentes comprimentos de onda, havendo ainda a possibilidade de marcar o pico de interesse e solicitar ao *Workstation* do equipamento o seu espectro de absorção. Como o espectro de absorção é uma característica intrínseca de cada molécula, caso o do pico do eluído seja igual ao do pico do padrão, a confirmação será garantida e a seletividade assegurada (LANÇAS, 2016; OSHITA e JARDIM, 2015). Essa estratégia fornece a possibilidade de se realizar, inclusive, uma análise qualitativa mais precisa do analito.

Com relação à técnica por CG/DCE, esta também permite uma elevada seletividade, pois somente compostos que apresentam eletroafinidade podem ser detectados (LANÇAS, 2017), o que explica os cromatogramas relativamente limpos obtidos dos extratos das amostras de alimentos (Anexo 1).

### 5.5.3 Sensibilidade

A sensibilidade das técnicas instrumentais foi expressa mediante determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). Tais limites, expressos em ng/L, e calculados a partir da curva analítica (Tabela 9).

**Tabela 9.** Sensibilidade obtidas para análise do inseticida piretróide bifentrina mediante as diferentes técnicas cromatográficas

<b>Técnica</b>	<b>Limite de detecção</b>	<b>Limite de quantificação</b>
<b>Analítica</b>	<b>(ng/L)</b>	<b>(ng/L)</b>
CLAE/DAD	7,4	24,5
CG/DCE	2,1	7,1

Fonte: a autora.

Os resultados da Tabela 9 evidenciaram que a técnica CG/DCE apresentou maior sensibilidade, quando comparada à CLAE/DAD, e isso se deve principalmente ao detector empregado. Na utilização de detecção por arranjo de fotodiodos, muito utilizada nos métodos envolvendo cromatografia a líquido, é necessário que a amostra contenha grupos cromóforos e que seja, a partir da sua absorção no ultravioleta, estabelecido o comprimento de onda de máxima absorção (JESUS et al., 2015). A bifentrina é constituída por grupos C=O, o que possibilita a detecção por CLAE/DAD.

O detector por captura de elétrons (DCE), por sua vez, mostrou-se ainda mais específico, pois o composto contém átomos de halogênios (F e Cl), além de vários átomos de oxigênios (O), o que confere à molécula uma elevada eletroafinidade e um alto poder de detecção no sistema. Isso torna o método empregado CG/DCE muito mais sensível, o que é uma grande vantagem quando se trata de análise de resíduos da bifentrina em alimentos, pois quantidades ínfimas do composto podem ser facilmente detectadas (SKOOG et al., 2006).

O DCE utilizado nesse trabalho possui fonte de radiação Ni<sup>63</sup>; tal fonte ioniza o gás de arraste (hélio) e produz elétrons. Na presença de elementos eletronegativos, ocorre a captura de elétrons e a consequente diminuição da corrente, que é medida por um par de eletrodos. Após a diminuição da corrente, na presença do composto, o pico cromatográfico é registrado pelo *software* (POOLE, 2015). A elevada eletronegatividade de alguns átomos na molécula da bifentrina tornou maior a sensibilidade do método, em função do forte sinal registrado no detector.

O DCE é considerado o segundo detector mais utilizado em análises por cromatografia a gás, daí ser muito aplicado em análises de amostras

ambientais, devido à alta sensibilidade na determinação de pesticidas e produtos químicos que agredem a camada de ozônio, como também em amostras biológicas, na análise de drogas e hormônios.

Nessa etapa, foi avaliada não só a eficiência dos procedimentos de preparo de amostra, baseado na extração em forno microondas, seguindo de *clean-up* por EFS, como também a aplicação das distintas técnicas para análise de alimentos reais. Apesar das matrizes de alimentos processados, selecionadas para essa fase de otimização, serem consideradas complexas, os resultados mostraram-se satisfatórios, podendo os dois métodos serem empregados.

Em estudos anteriores, foram testados diferentes procedimentos de extração para análise da bifentrina (WANG et al., 2018). Os autores, por fim, desenvolveram um método por CLAE/UV com extração assistida por microondas (EAM), seguida de microextração líquido-líquido dispersiva. Em tal trabalho, as condições operacionais da EAM também coadunaram com os princípios da química verde, pois os autores utilizaram um pequeno volume de etanol para extrair o composto da polpa de pêssego, num tempo total de 4min. De forma similar ao presente estudo, os autores fixaram o comprimento de onda em 220nm e, como fase móvel para o sistema de CL, foi empregada a mistura metanol/água (82:18), com separação operacionalizada no modo isocrático e uma coluna C<sub>18</sub>.

#### 5.5.4 Exatidão e precisão

As figuras de mérito *exatidão* e *precisão* referem-se ao método analítico como um todo. Dessa forma, foi avaliada não só a eficiência dos procedimentos de preparo de amostra, baseados na extração em forno microondas, seguido de *clean up* por EFS, como também a aplicação das distintas técnicas cromatográficas para análise de amostras reais.

A exatidão foi determinada mediante ensaios de recuperação e, para tanto, as amostras selecionadas para os ensaios (biscoito e extrato de tomate) foram fortificadas em uma concentração final de 2mg/Kg e submetidas à análise completa pelos métodos otimizados (n =2).

A Tabela 10 apresenta os resultados dos testes de eficiência,

baseada na exatidão, para os dois métodos. A amostra de biscoito obteve menor recuperação ( $p < 0,005$ ,) quando comparada à amostra de extrato de tomate, em ambas as técnicas analíticas. Isso ocorreu provavelmente devido ao maior teor em lipídeos que, segundo López-Blanco et al (2016), dificulta o processo de extração/*clean up*.

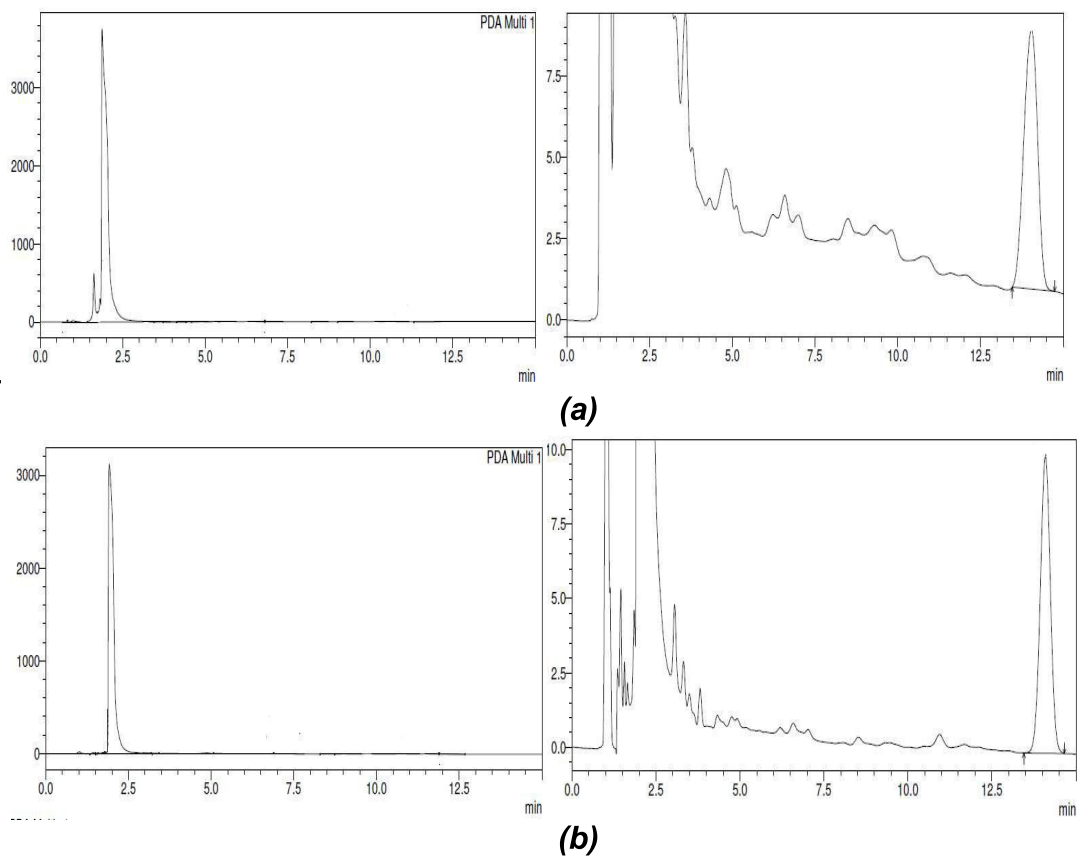
**Tabela 10.** Exatidão dos métodos para análise do inseticida piretróide bifentrina, baseados nas diferentes técnicas cromatográficas

Técnicas Cromatográficas	Amostra	Nível de fortificação (mg/Kg)	Conc. Encontrada (mg/Kg)	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação Média Total (%)
<b>CLAE/DAD</b>	Extrato de tomate	2	2,02	101,1a	0,50	93,7a
	Biscoito <i>wafer</i>	2	1,73	86,4b	1,15	
<b>CG/DCE</b>	Extrato de tomate	2	2,0	99,5a	0,89	94,7b
	Biscoito <i>wafer</i>	2	1,8	90,0a	3,59	

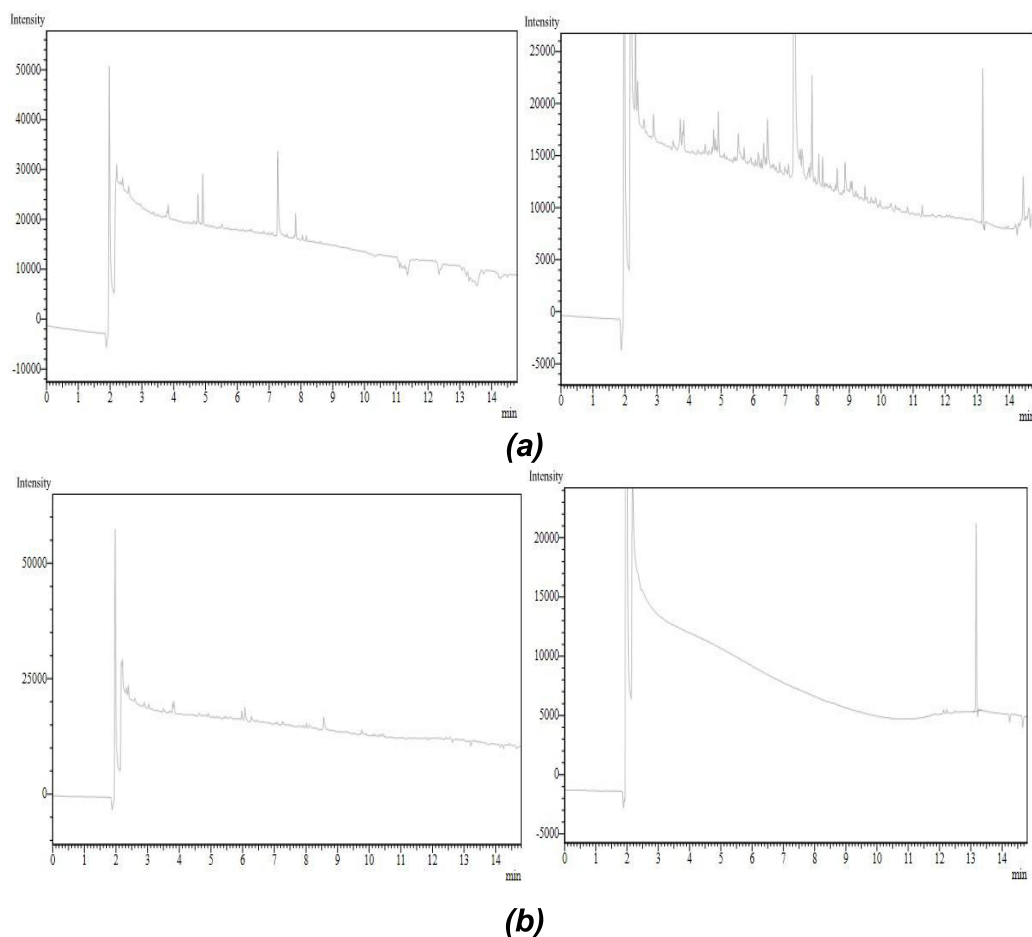
\*Valores aceitáveis de recuperação: 70 a 120%. Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste t de *Student* não pareado, no nível de 95% de probabilidade. C.V = coeficiente de variação. Fonte: a autora

Observou-se ainda que, apesar das diferenças instrumentais, o processo de preparo da amostra foi o mesmo, o que possibilitou a obtenção de médias gerais dos índices de recuperação estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ). O teste t de *Student* não pareado forneceu valores de t calculado e t tabelado de 18,6 e 4,303, respectivamente, para um nível de 95% de probabilidade, indicando que os resultados obtidos após a análise utilizando o método CLAE/DAD foram estatisticamente distintos em relação à exatidão para as duas matrizes. Porém, os resultados para o método por CG/DCE não diferiram, pois o t calculado = 0,004 foi inferior ao tabelado, na mesma probabilidade estatística. Portanto, pode-se inferir que o efeito de matriz afetou de forma mais intensiva o método baseado na técnica CLAE/DAD.

As figuras 9 e 10 apresentam os cromatogramas obtidos por ocasião das análises das amostras de alimento, com e sem fortificação, mediante emprego dos métodos baseados em CLAE/DAD e CG/DCE, respectivamente.



**Figura 9.** Cromatogramas das amostras não dopadas (à esquerda) e dopadas (à direita) dos seguintes alimentos industrializados: extrato de tomate (a) e do biscoito wafer (b) - método baseado na CLAE/DAD. Fonte: a autora.



**Figura 10.** Cromatogramas das amostras não dopadas (à esquerda) e dopadas (à direita) dos seguintes alimentos industrializados: extrato de tomate (a) e biscoito wafer (b) - método baseado na CG/DCE. Fonte: a autora.

Mais uma vez, foi possível observar que as substâncias co-extraídas não resultaram em nenhuma interferência nas análises. O efeito de elevação da linha de base, provocado pela presença desses compostos, foi bem mais pronunciado no método empregando CG/DCE. Contudo, isso não dificultou a integração dos picos nem a quantificação da bifentrina. Perfil cromatográfico semelhante foi encontrado por Matsadiq et al. (2018), ao identificarem e quantificarem este inseticida em amostras de polpas de pêssego.

Em relação à precisão, os dados da Tabela 10 mostram que ambos os métodos analíticos foram também considerados satisfatórios, pois apresentaram valores de coeficiente de variação bem abaixo do limite aceitável para análise de resíduos ( $CV \leq 10\%$ ). Após otimização dos métodos, verificou-se que ambos podem ser aplicados às análises de traços do inseticida bifentrina em

amostras de alimentos industrializados, já que apresentaram adequadas eficiência, sensibilidade, precisão e exatidão.

Comparativamente, a sensibilidade do método baseado na técnica CG/DCE foi maior, tendo sido ainda mais rápido e mais barato, o que o torna ainda mais apropriado para fins de análises de traços.

Além dessas figuras de mérito, que caracterizaram um método analítico uma das características que também deve ser levada em consideração na sua escolha é o custo por análise. Fazendo-se uma estimativa de custo, considerando os materiais utilizados, padrões, solvente (para CLAE/DAD) e gás (CG/DCE), água, energia, valor hora/homem, entre outros custos, chega-se aos valores aproximados de R\$ 28,00 e R\$ 23,00 para uma única análise empregando os métodos baseados em CL e CG, respectivamente.

Para trabalhos de rotina em laboratórios, nos quais centenas de amostras são analisadas por dia, a economia anual pode ser expressiva, quando se utiliza o método baseado em CG/DCE. Por essa razão, esse método foi escolhido para a realização das análises das amostras que apresentaram suspeita de contaminação pelo inseticida bifentrina.

## **5.6 Análise dos Alimentos Industrializados e Embalagens**

Foram realizadas as análises das amostras dos alimentos listados na Tabela 4, mediante emprego do método baseado na técnica CG/DCE, com o objetivo de eliminar (ou confirmar) a contaminação nos alimentos e algumas das embalagens. Nenhuma das amostras analisadas apresentou resíduos do pesticida, e os cromatogramas apresentados nos anexos 2 e 3 comprovaram esses resultados.

Desta forma, foi descartada, de forma confiável, a contaminação, pelo inseticida bifentrina, dos produtos alimentícios investigados.



## 6 Conclusão

Nesse trabalho, foram desenvolvidos, otimizados e comparados dois métodos para análise do inseticida bifentrina em amostras de alimentos industrializados, sendo que estes apresentavam características e constituições das mais variadas. Os métodos tinham em comum os procedimentos de extração e *clean up*, porém diferiram nas técnicas cromatográficas (CLAE/DAD e GC/DCE) empregadas na detecção e quantificação do pesticida. Ambos os métodos mostraram-se seletivos, exatos e precisos, porém o método por CG/DCE apresentou maior sensibilidade, menor custo e maior rapidez. Este método foi, então, selecionado para a etapa de avaliação das amostras reais.

A pesquisa comprovou que as amostras de alimentos coletadas em um supermercado de São Luís, MA, que se encontrava sob intervenção oficial, não estavam contaminadas pelo inseticida bifentrina.

As metodologias desenvolvidas mostraram-se altamente adequadas e servirão para uso em análises de rotina desses tipos de alimentos. Tendo em vista que o inseticida bifentrina vem sendo comumente utilizado em procedimento de controle integrado de pragas, a metodologia otimizada aqui poderá servir como método oficial a ser utilizado pela Vigilância Sanitária para rastreamento de contaminações alimentares.

## Referências Bibliográficas

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 162, de 28 de Agosto de 2003**. Brasília, DF, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para Qualidade em Química Analítica** - Uma Assistência a Acreditação, v. 1, 1ªed, Brasília, 2004.

BARRIGOSI, J. A. F.; LANNA, A. C.; FERREIRA, E. Circular Técnica: inseticidas Registrados para a Cultura do Arroz e Análise de Parâmetros Indicadores de seu Comportamento no Ambiente. **Circular Técnica: EMBRAPA**, Goiás, 2005. ISSN 1678-9636.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos Agrotóxicos. **Quim. Nova Esc.**, v. 34, nº 1, p. 10-15, 2012.

FEO, M. L.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. A rapid and sensitive analytical method for the determination of 14 pyrethroids in water samples. **J. of Chromatogr. A**, v. 1217, p. 2248–53, 2010.

FORSGREN, K. L.; RIAR, N.; SCHLENK, D. The effects of the pyrethroid insecticide, bifenthrin, on steroid hormone levels and gonadal development of steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) under hypersaline conditions. **Gen. And Comp. Endocrinol.**, v. 186, p. 101-107, 2013.

FREITAS, R. S.; QUEIROZ, M. E. L. R.; FARONI, L. R. D'A.; HELENO, F. F.; MOURA, V. V. Desenvolvimento do método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura para determinação de inseticidas em grãos de milho ozonizados. **Quim. Nova Esc.**, v. 37, p. 238-43, 2014.

GARCIA, A. J. N.; GONZÁLEZ, R. R.; FRENICH, A. G. Multi-pesticide residue analysis in nutraceuticals from grape seed extracts by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Food Cont.**, v. 47, p. 369–80, 2015.

GLORENNEC, P.; SERRANO, T. FRAVALLO, M.; WAREMBOURG, C.; MONFORT, C.; CORDIER, S.; VIEL, J. F.; GLÉAU, F. L.; BOT, B. L. Determinants of children's exposure to pyrethroid insecticides in western France. **Environ. Int.**, v. 104, p. 76-82, 2017.

GRIMALT, S.; DEHOUCK, P. Review of analytical methods for the determination of pesticide residues in grapes. **J. Chromatogr. A**, v. 1433, p. 1-3, 2016.

HUANG, X.; ZHAO X.; LU, X.; TIAN, H.; XU, A.; LIU, Y.; JIAN, Z. Simultaneous determination of 50 residual pesticides in Flos Chrysanthemi using accelerated solvent extraction and gas chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 967, p. 1–7, 2014.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª Ed., IAL, Brasília, 2005.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, Brasília, DF, 2003.

IUPAC. União de Química Pura e Aplicada. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/index2.htm>, Acesso em 10/03/18.

JARDIM, I. C. S. F. J. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Sc. Chromatogr.**, v.2, nº1, 13-25, 2010.

JESUS, R. A.; SANTOS, L. F. S.; NAVICKIENE, S.; MESQUITA, M. E. Evaluation of Metal-Organic Framework as Low-Cost Adsorbent Material in the Determination of Pesticide Residues in Soursop Exotic Fruit (*Annonamuricata*) by Liquid Chromatography. **Food Anal. Met.**, v.8, p. 446-51, 2015.

JURASKE, R.; MUTEL, C. L.; STOESSEL, F.; HELLWEG, S. Life cycle human toxicity assessment of pesticides: Comparing fruit and vegetable diets in Switzerland and the United States. **Chemosphere**, v. 77, p. 939-45, 2009.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. Editora Átomo,. Campinas, SP, 2016.

LANÇAS, F. M. **Fundamentos da Cromatografia Gasosa Moderna**. Editora Átomo,. Campinas, SP, 2017.

LI, H.; CHENG, F.; WEI, Y.; LYDY, M. J.; VOCÊ, J. Global occurrence of pyrethroid insecticides in sediment and the associated toxicological effects on benthic invertebrates: An overview. **J. Hazard. Mat. B**, v. 324, p. 258-71, 2017.

LI, W.; MORGAN, M. K.; GRAHAM, S. E.; STARR, J. M. Measurement of pyrethroids and their environmental degradation products in fresh fruits and vegetables using a modification of the quick easy cheap effective rugged safe (QuEChERS) method. **Talanta**, v. 151, p.42-50, 2016.

LI, X. J.; WANG, W.; LUO, M.; LI, C. Y.; ZU, Y. G.; MU, P. S.; FU, Y. J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from *Dryopteris fragrans* and evaluation of antioxidant activity. **Food Chem.**, v. 133, p.437-44, 2012.

LIU, H.; KONG, W.; GONG, B.; MIAO, Q.; QI, Y.; YANG, M. Rapid analysis of multi-pesticides in *Morinda officinalis* by GC–DCE with accelerated solvent extraction assisted matrix solid phase dispersion and positive confirmation by GC–MS. **J. Chromatogr. B**, v.974, p. 65-74, 2015.

LÓPEZ-BLANCO, R.; NORTES-MÉNDEZ, R.; ROBLES-MOLINA, JOSÉ.; MORENO-GONZÁLEZ, D.; GILBERT-LÓPEZ.; GARCÍA-REYES, J. F.; MOLINA-DÍAZ, A. Evaluation of different cleanup sorbents for multiresidue pesticide analysis in fatty vegetable matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1456, p. 89-104, 2016.

ŁOZOWICKA, BOŻENA. The development, validation and application of a GC-dual detector (NPD-DCE) multi-pesticide residue method for monitoring bee poisoning incidents. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**,v. 97, p. 210–222, 2013.

LOZOWICKA, B.; KACZYNSKI, P.; PARITOVA, A. E.; KUZEMBEKOVA, G. B.; ABZHALIEVA, A. B.; SARSEMBAYEVA, N. B.; ALIHAN, K. Pesticide residues in grain from Kazakhstan and potential health risks associated with exposure to detected pesticides. **Food Chem. Toxicol.**, v. 64, p. 238-248, 2014.

MANSOOR, M. M.; AFZAL, M. B. S.; BASOALTO, E.; RAZA, A. B. M. BANAZEER, A. Selection of bifenthrin resistance in cotton mealybug *Phenacoccus solenopsistinsley* (Homoptera: Pseudococcidae): Cross-resistance, realized heritability and possible resistance mechanism. **Crop Protect.**, v. 87,p. 55–59, 2016.

MASTSADIQ, G.; HU. H-L.; REN, H-B.; ZHOU, Y-W.; LIU, L.; CHENG, J.; Quantification of multi-residue levels in peach juices, pulps and peels using dispersive liquid–liquid microextraction based on floating organic droplet coupled

with gas chromatography-electron capture detection. **J. Chromatogr. B**, v. 879, ed. 22, p. 2113-18, 2011.

MATTREY, F. T.; MAKAROV, A. A.; REGALADO, E. L.; BERNARDONI, F.; FIGUS, M.; HICKSM. B.; ZHENG, J.; WANG, L.; SCHAFER, W.; ANTONUCCI, V.; HAMILTON, S. E. ZAWATZKY, K.; WELCH, C. J. Current challenges and future prospects in chromatographic method development for pharmaceutical research. **Trends Anal. Chem.**, v. 95, p. 36-46, 2017.

MIAO, Q.; KONG, W.; YANG, S.; YANG, M. Rapid analysis of multi-pesticide residues in lotus seeds by a modified QuEChERS-based extraction and GC-ECD. **Chemosphere**, v. 91, p. 955-62, 2013

MINBS IV, W. H.; CUSAC, J. P. W.; SMITH, L. M; McMURRY, S. T. Occurrence of current-use fungicides and bifenthrin in Rainwater Basin wetlands. **Chemosphere**, v. 159, pg. 275-81, 2016.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S F. Comparação de métodos por cromatografia líquida na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morangos. **Quim. Nova Esc.**, v. 39, nº 10, p. 1273-81, 2015.

PANDEY, R.; SHRIVASTAVA, L. S. Comparative evaluation of rice bran oil obtained with two-step microwave assisted extraction and conventional solvent extraction. **J. Food Engin.**, September 2017.

PARENTE, C. E. T.; LESTAYO, J.; GUIDA, Y. S.; AZEVEDO-SILVA, C. E.; TORRES, J. P. M. MEIRE, R. O.; MALM, O. Pyrethroids in chicken eggs from commercial farms and home production in Rio de Janeiro: Estimated daily intake and diastereomeric selectivity. **Chemosphere**, v. 184, p. 1261-69, 2017.

PARK, JI-YEON.; CHOI, JEONG-HEUI.; EL-ATY, A. M. A.; KIM, B. M.; OH, JAE-OH.; DO, JUNG-AH.; KWON, K. S.; SHIM, KI-HOON.; CHOI, OK-JA.; SHIN, S. C.; SHIN, JAE-HAN. Simultaneous multiresidue analysis of 41 pesticide residues in cooked foodstuff using QuEChERS: Comparison with classical method. **Food Chem.**, v.128, p. 241-53, 2011.

PENG, L. Q.; YE, L.; CAO, J.; CHANG, Y.; LI, Q.; AN, M.; TAN, Z.; XU, J. Cyclodextrin-based miniaturized solid phase extraction for biopesticide Occurrence of current-use fungicides and bifenthrin in Rainwater. **Chemosphere**, v. 159, p.

275-81, 2016.

PENNINGTON, P. L.; HARPER-LAUX, H.; SAPOZHNIKOVA, Y.; FULTON, M. H. Environmental effects and fate of the insecticide bifenthrin in a salt-marsh mesocosm. **Chemosphere**, v. 112, p. 18-25, 2014.

PETRARCA, M. H.; CCANCCAPA-CARTAGENA, A.; GODOY, H. T.; PICÓ, Y. Comparison of green sample preparation techniques in the analysis of pyrethrins and pyrethroids in baby food by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1497, p.28-37, 2017..

PLONKA, M.; WARLORCZYK, S.; MISZCZYK, M. Chromatographic methods for the determination of active substances and characterization of their impurities in pesticide formulations. **Trends Anal. Chem.**, v. 85, p.67-80, 2016.

POOLE, C. F. Ionization-based detectors for gas chromatography. **J. Chromatogr. A**, p. 137–153, 2015.

PUBCHEM (2014). Open Chemistry Data Base. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281872#section=2D-Structure>, Acesso em 19/03/2018.

QIN, G. LI, Y.; CHEN, Y.; SUN, Q.; ZUO, B.; HE, F.; SHEN, N.; JIA, G.; DING, G. Pesticide residues determination in China vegetables in 2010–2013 applying gas chromatography with mass spectrometry. **Food Res. Int.** v. 72, p. 161–67, 2015.

RIAR, K. N. Bifenthrin. **Reference Module in Biomedical Sciences. Encyclopedia of Toxicology** 3rd. Edition, Academic Press, United States of America, p. 449-51, 2014.

SAILLENFAIT, A. M.; NDIAYE, D.; SABATÉ, J. P. Pyrethroids: Exposure and health effects – An update. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v. 218, p.281–92, 2015.

SAILLENFAIT, A. M.; NDIAYE, D.; SABATÉ, J. P. The estrogenic and androgenic potential of pyrethroids in vitro. Review. **Toxicol. in Vitro**, v. 34, p. 321 – 32, 2016.

SAMSIDAR, A.; SIDDIQUEE, S.; MD SHAARANI, S. A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 71, p. 188-201, 2018.

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. **J. Food Comp. Anal.**, v. 26, p. 183–188, 2012.

SAVI, G. D.; PIANCENTINI, K. C.; BORTOLOTTI, T.; SCUSSEL, V. M. Degradation of bifenthrin and pirimiphos-methyl residues in stored wheat grains (*Triticumaestivum* L.) by ozonation. **Food Chem.**, v. 203, p. 246-51, 2016.

SILVÉRIO, F. O.; SILVA, J. G. S.; AGUIAR, M. C. S.; CACIQUE, A. P.; PINHO, G. P. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Quim. Nova Esc.**, v. 35, p. 2052-56, 2012.

SLOWIK-BOROWIEC, M.; SZPYRKA, E.; WALORCZYK, S. Gas chromatographic determination of pesticide residues in white mustard. **Food Chem.**, v. 173, p. 997-1005, 2015.

SOUZA, M. R. R.; MOREIRA, C. O.; LIMA, T. G.; AQUINO, A.; DÓREA, H. S. Validation of a matrix solid phase dispersion (MSPD) technique for determination of pesticides in lyophilized eggs of the chicken *Gallus domesticus*. **Microchem. J.**, v.110, p. 395-01, 2013.

TEWARY, D. K.; KUMAR, V.; RAVINDRANATH, S. D.; SHANKER, A. Dissipation behavior of bifenthrin residues in tea and its brew. **Food Cont.**, v. 16, p. 231-37, 2005.

TIENSTRA, M.; PORTOLÉS, T.; HERNÁNDEZ, F.; MOL, J. G. J. Fast gas chromatographic residue analysis in animal feed using split injection and atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1422, p. 289-98, 2015.

TSUKUI, A.; REZENDE, C. M. Extração assistida por micro-ondas e Química Verde. **Rev. Virt. Quim.**, ,v. 6,p. 1713-25, 2014..

YOSHIDA, T. Simultaneous determination of 18 pyrethroids in indoor air by gas chromatography/mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 5069–76, 2009.

WANG, K.; XIE, X.; ZHANG, Y.; HUANG, Y.; ZHOU, S.; ZHANG, W.; LIN, Y.; FAN, H. Combination of microwave-assisted extraction and ultrasonic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for separation and enrichment of pyrethroids residues in Litchi fruit prior to HPLC determination. **Food Chem.**, v. 240, p.1233-42, 2018.

WANG, X.; GAO, X.; ELE, B.; J, Y.; FU, Z. Cis-bifenthrin causes immunotoxicity in murine macrophages. **Chemosphere**, v 168, p. 1375-82, 2017.

WALORCZYK, S. Validation and use of a QuEChERS-based gas chromatographic–tandem mass spectrometric method for multiresidue pesticide analysis in blackcurrants including studies of matrix effects and estimation of measurement uncertainty. **Talanta**, v. 120, p. 106-13, 2014.

WU, L.; SONG, Y.; HU, M.; XU, X.; ZHANG, H.; YU, A.; MA, Q.; WANG, Z. Integrated microwave processing system for the extraction of organophosphorus pesticides in fresh vegetables. **Talanta**, v. 134, p. 366-73, 2015.

YU, X.; ANG, C. H.; YANG, H.; ZHENG, C.; ZHANG, Y. Low temperature cleanup combined with magnetic nanoparticle extraction to determine pyrethroids residue in vegetables oils. **Food Cont.**, v.74, p.112-20, 2017.

ZHANG, Y.; LU, M.; ZHOU, P.; WANG, C.; ZHANG, Q. ZHAO, M.; Multilevel evaluations of potential liver injury of bifenthrin. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 122, p. 29–37, 2015.

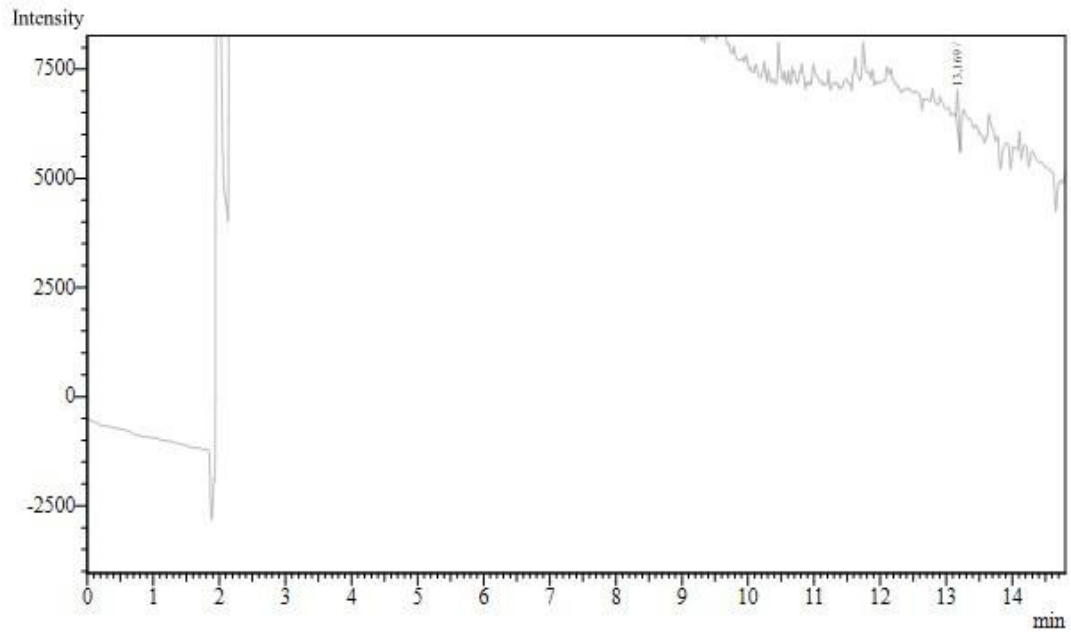


## **ANEXOS**

## Anexo 1:

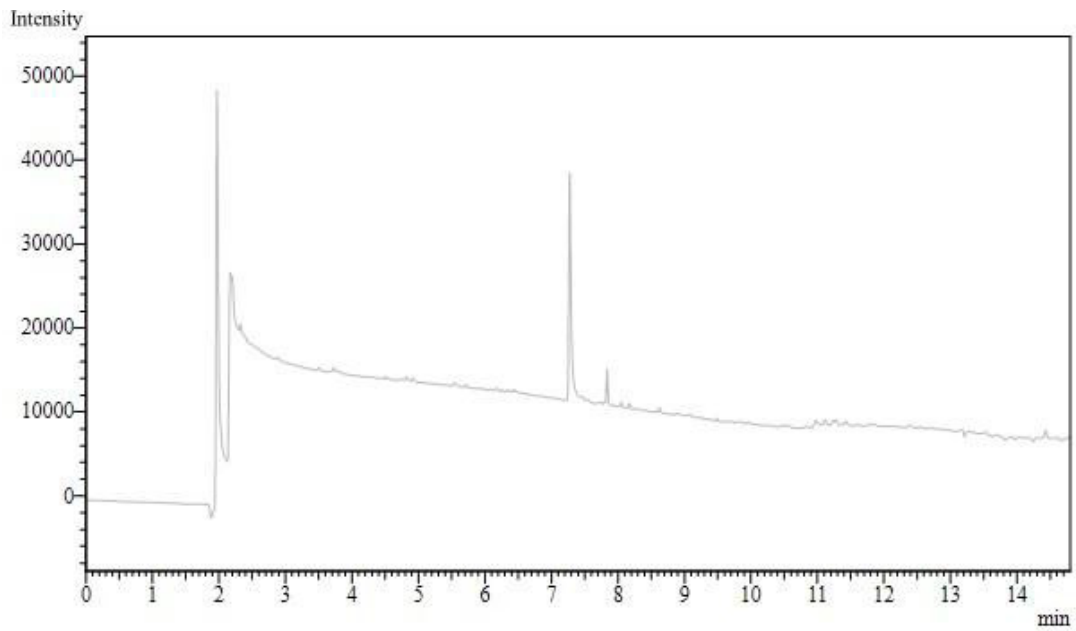
Cromatogramas das amostras de alimentos industrializados a (vide tabela 3)

### Cromatograma da amostra 01:



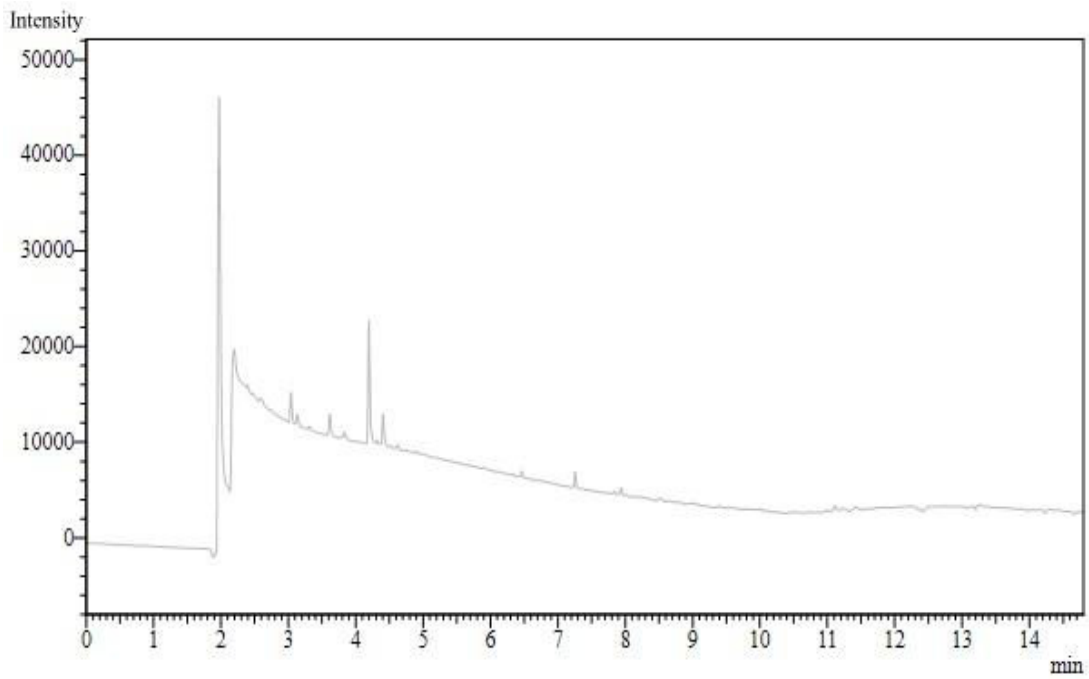
Fonte: a autora.

### Cromatograma da amostra 02:



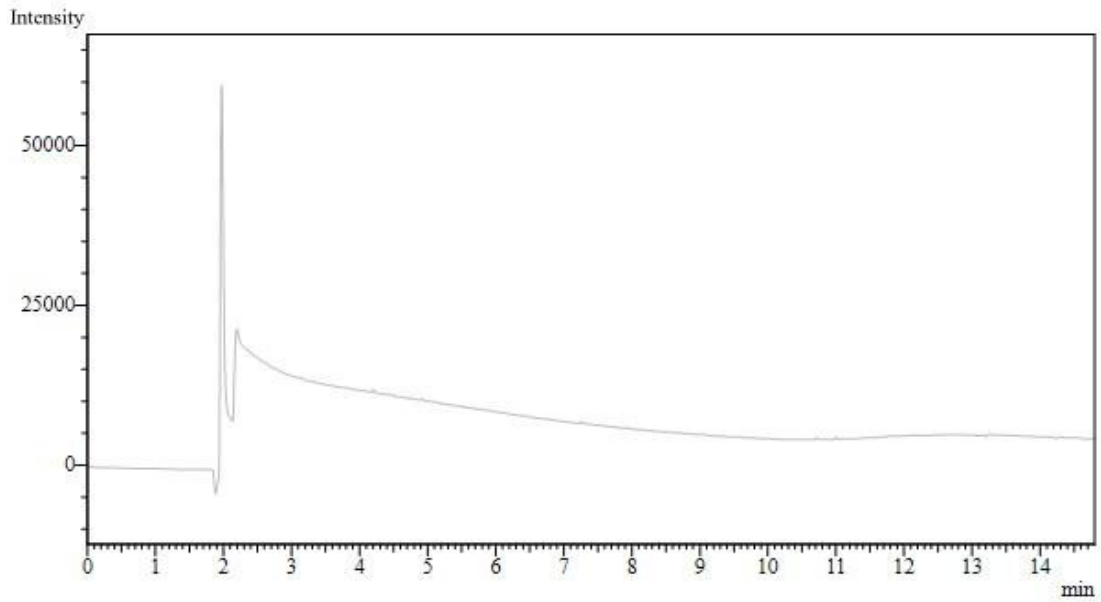
Fonte: a autora

### Cromatograma da amostra 03:



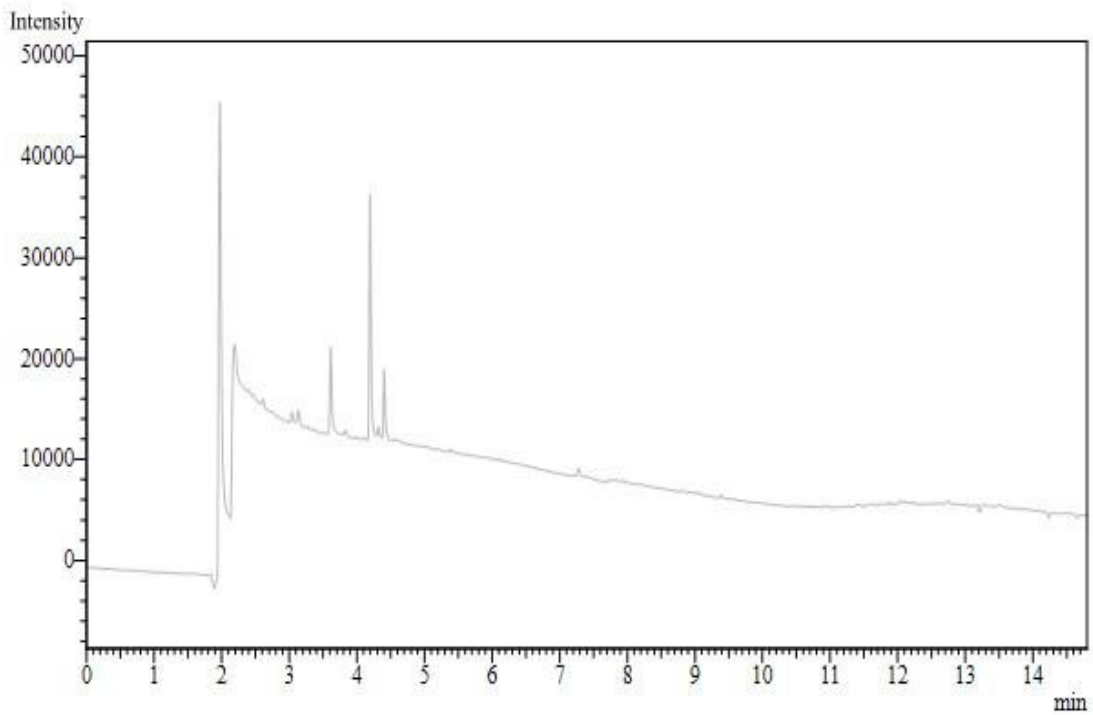
Fonte: a autora.

### Cromatograma da amostra 04:



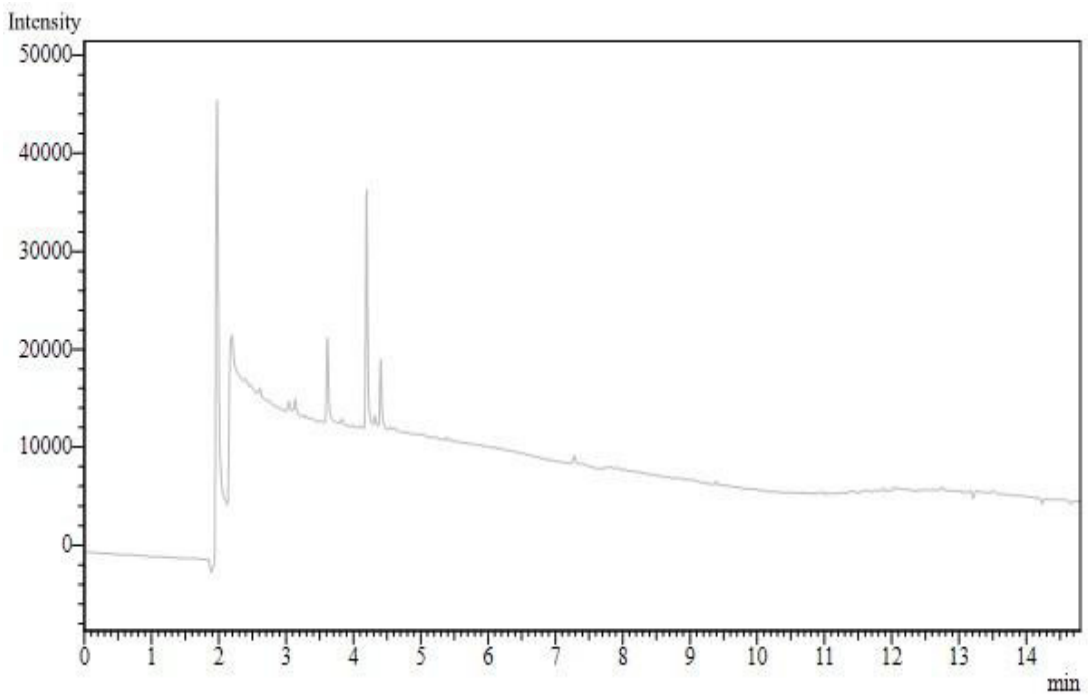
Fonte: a autora.

### Cromatograma da amostra 05:



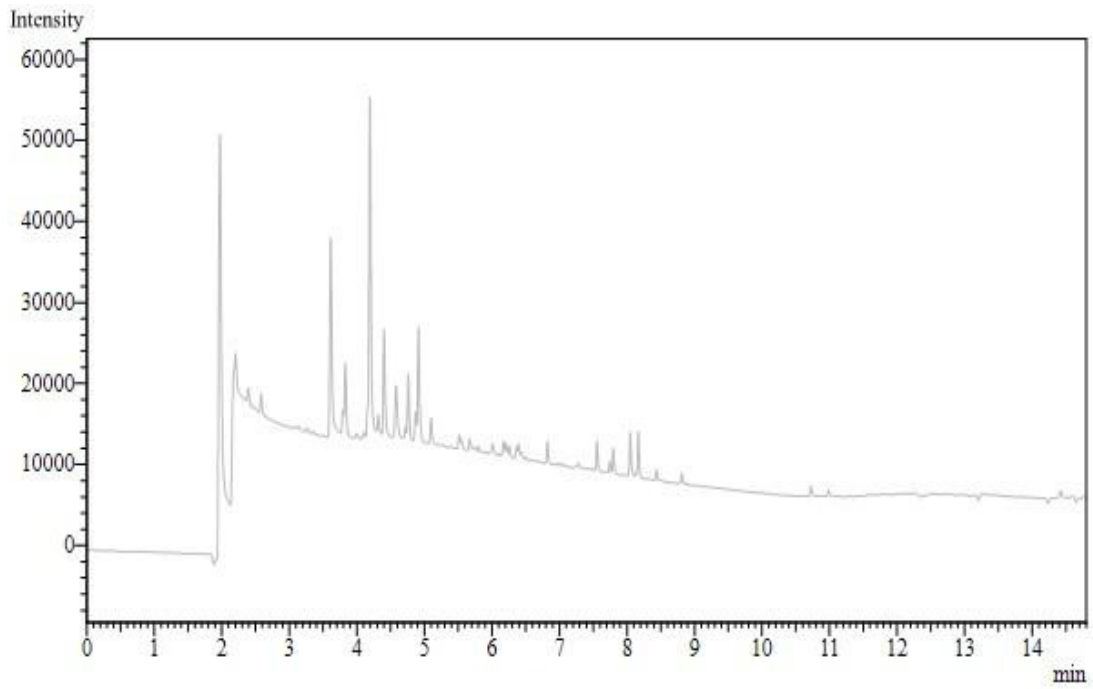
Fonte: a autora.

### Cromatograma da amostra 06:



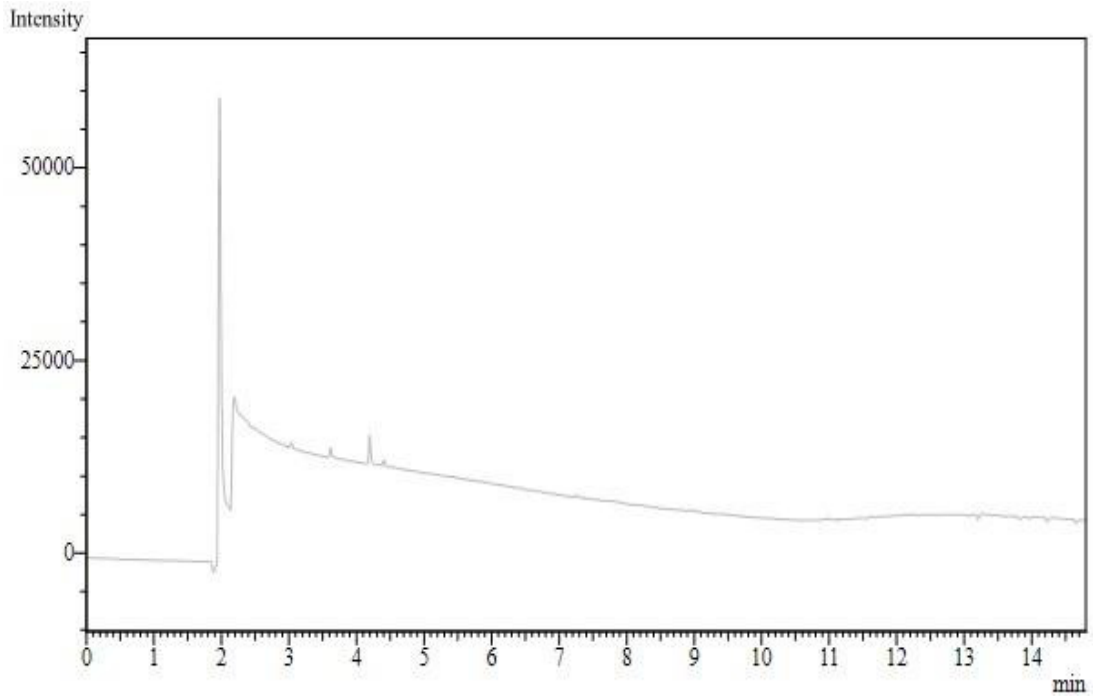
Fonte: a autora.

### Cromatograma da amostra 07:



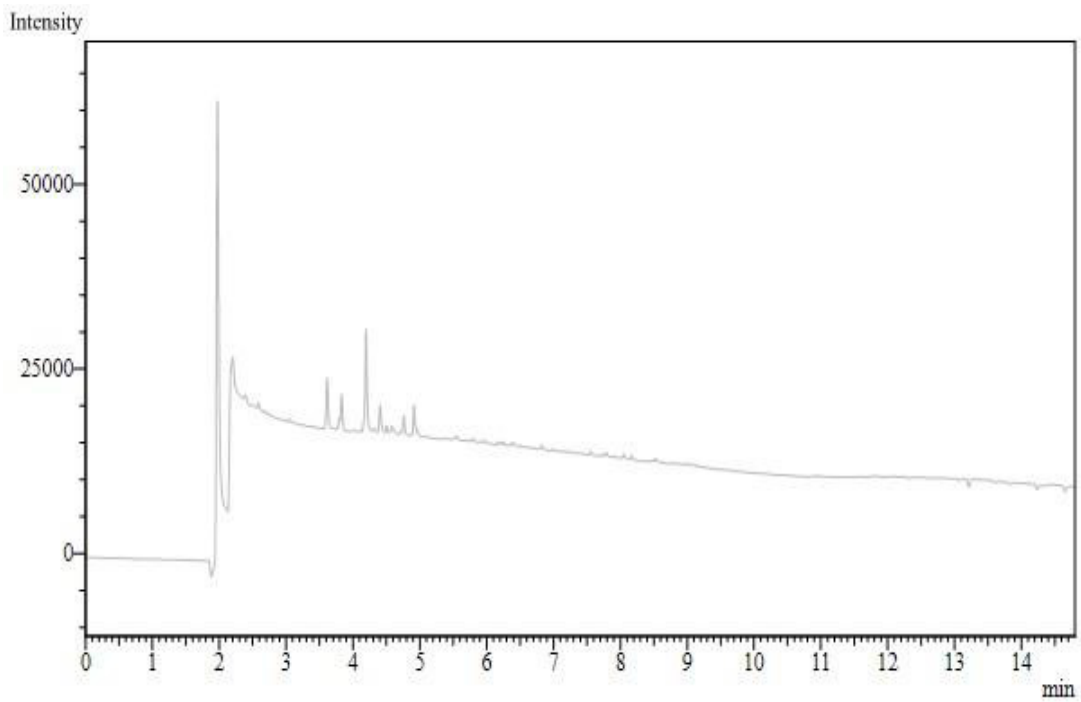
Fonte: a autora.

### Cromatograma da amostra 08:



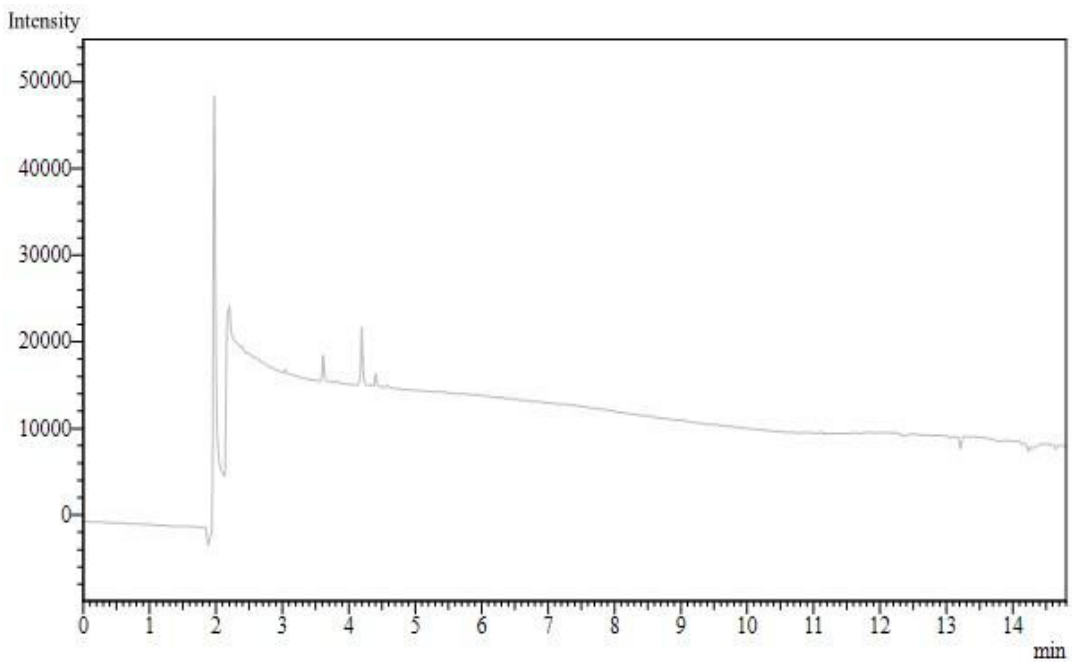
Fonte: a autora.

### Cromatograma da amostra 09:



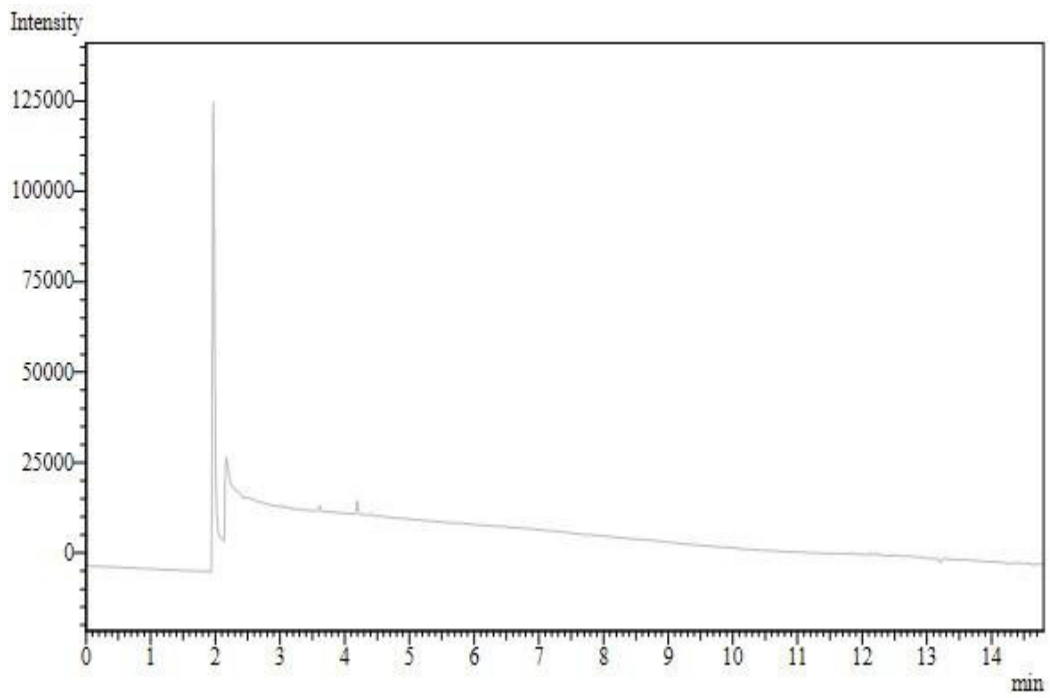
Fonte: a autora.

### Cromatograma da amostra 10:



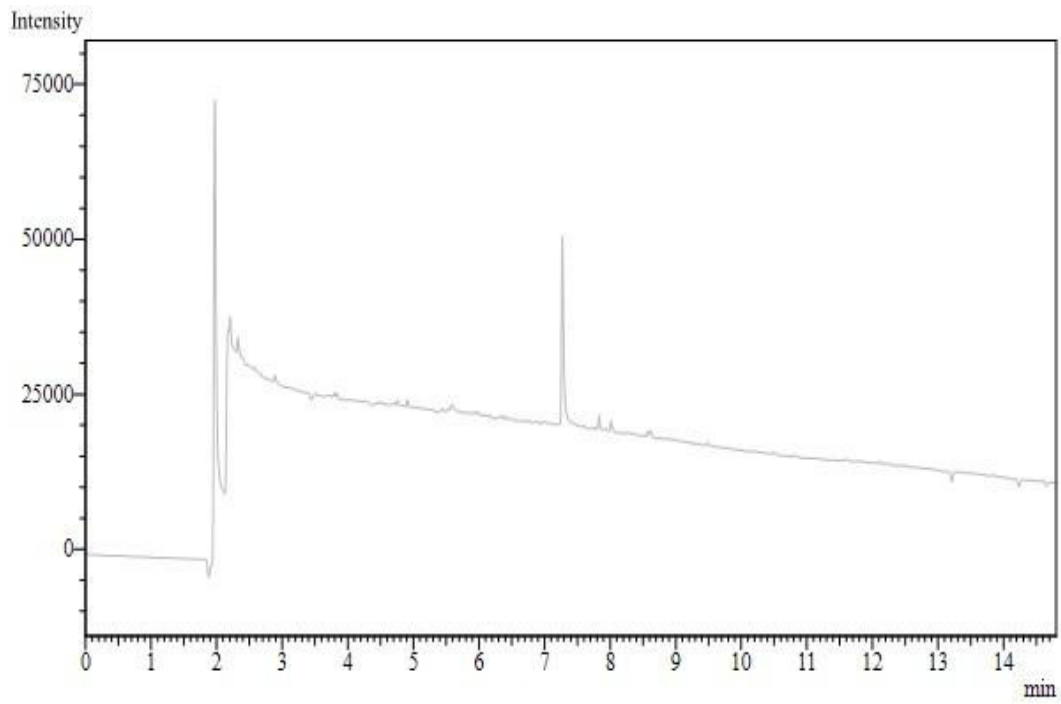
Fonte: a autora.

### Cromatograma da amostra 11:



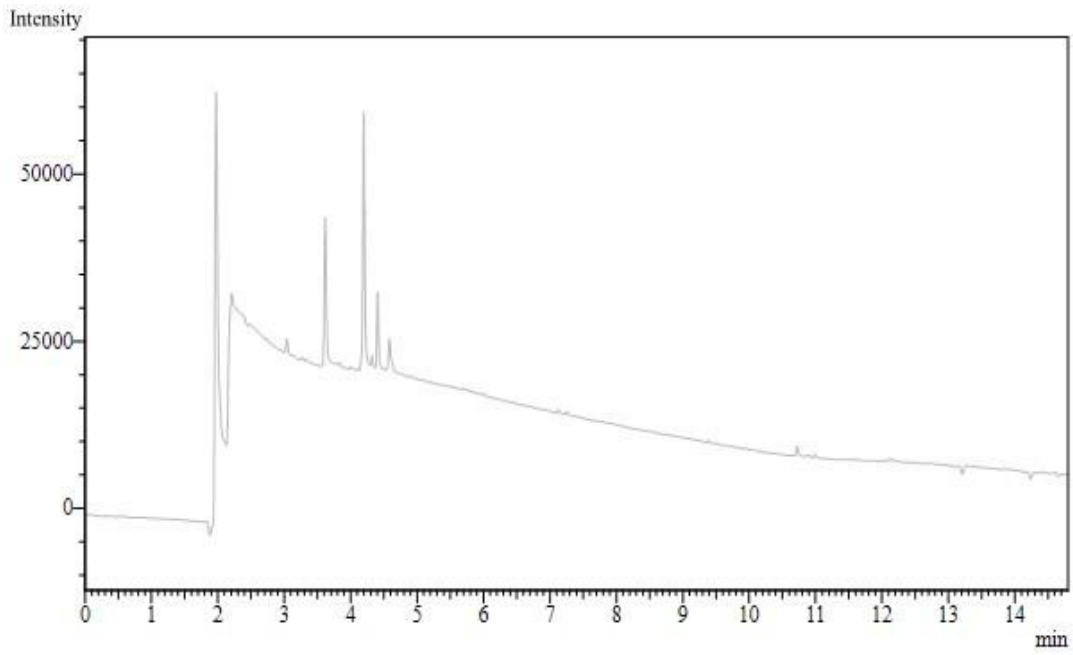
Fonte: a autora.

### Cromatograma da amostra 12:



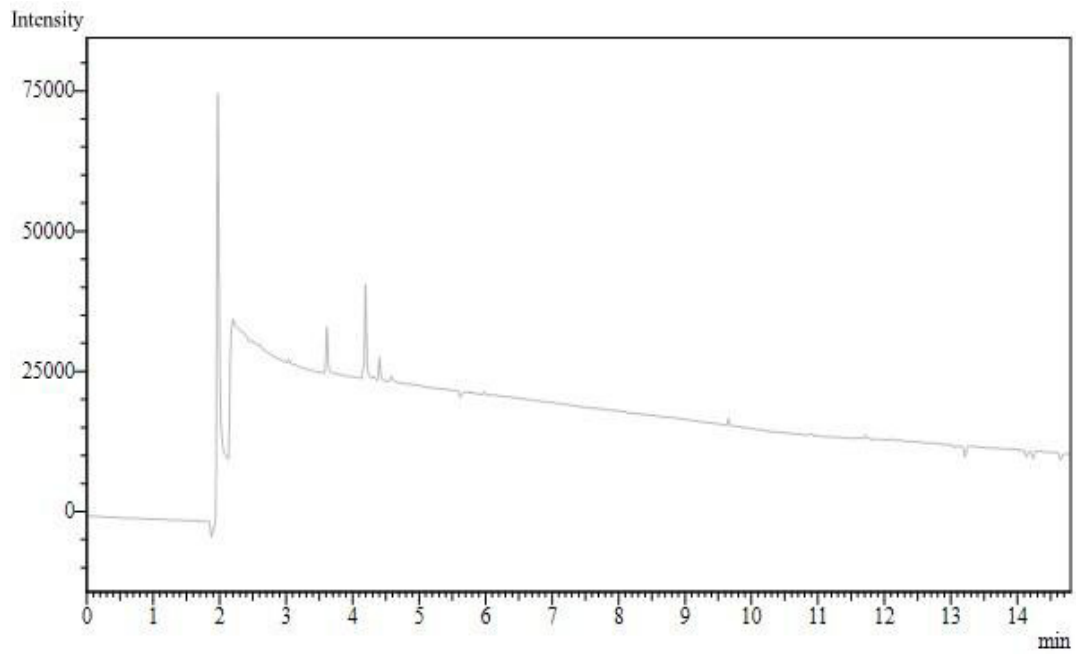
Fonte: a autora.

### Cromatograma da amostra 13:



Fonte: a autora.

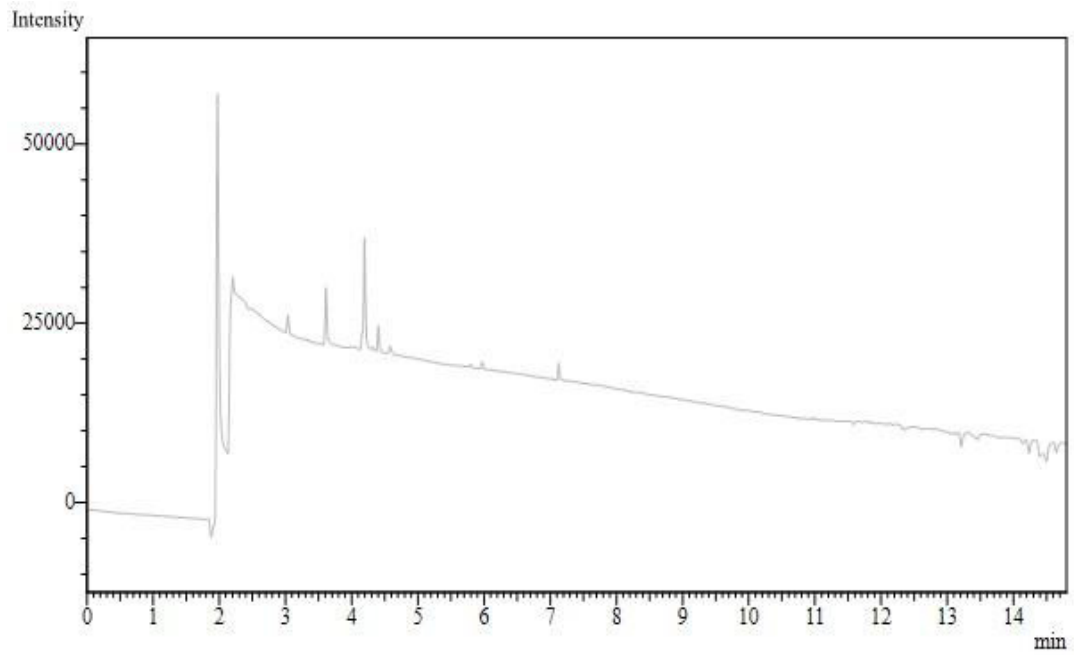
### Cromatograma da amostra 14:



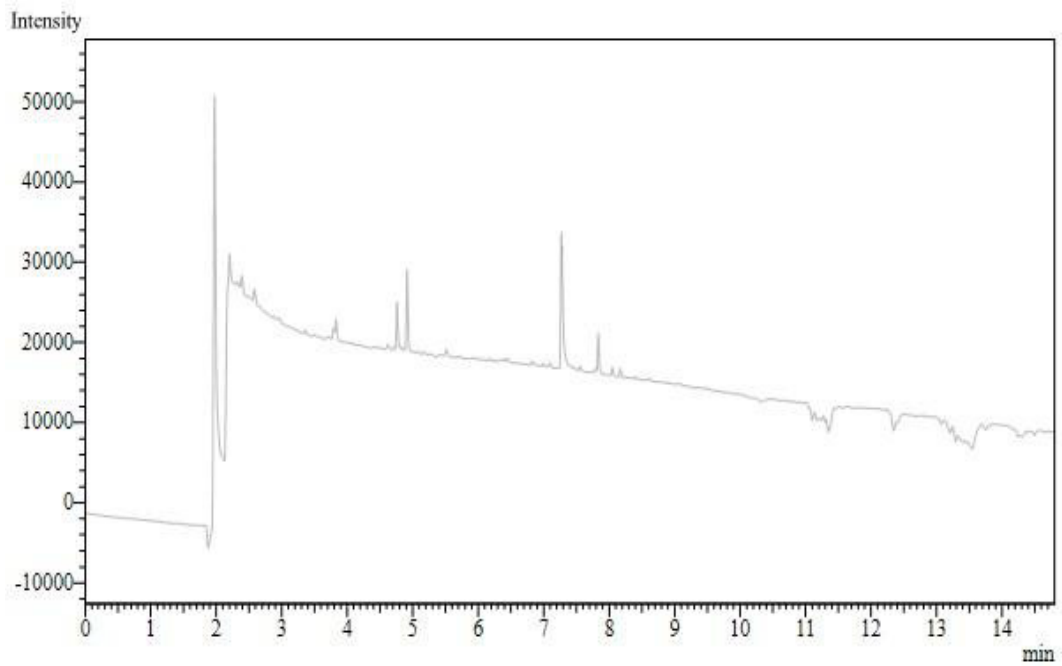
Fonte: a autora.



### Cromatograma da amostra15:

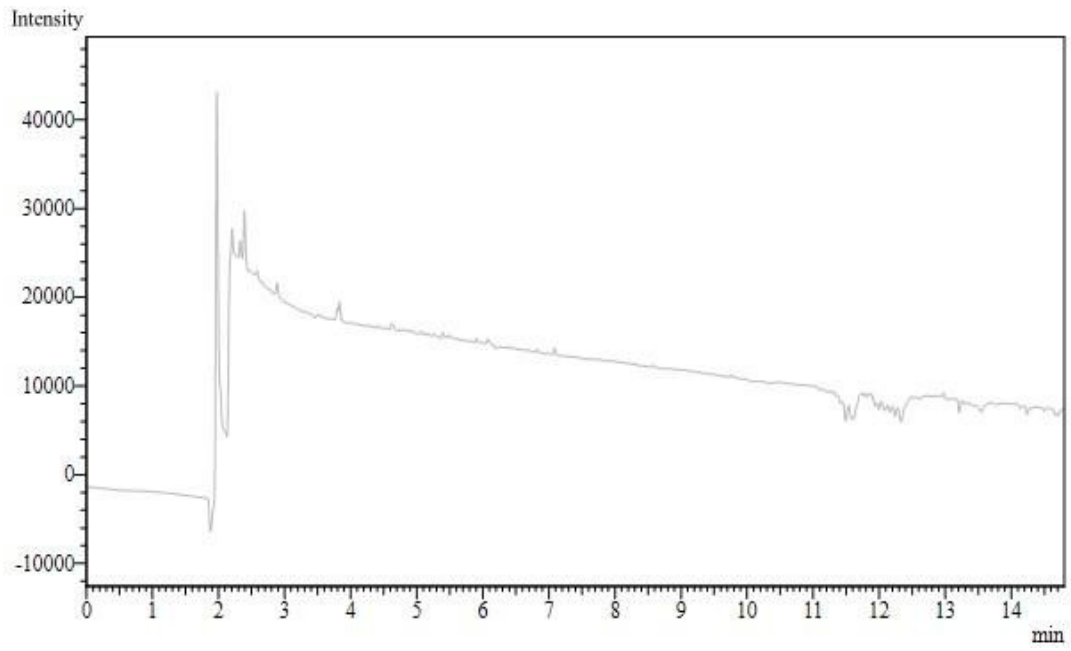


### Cromatograma da amostra 16:



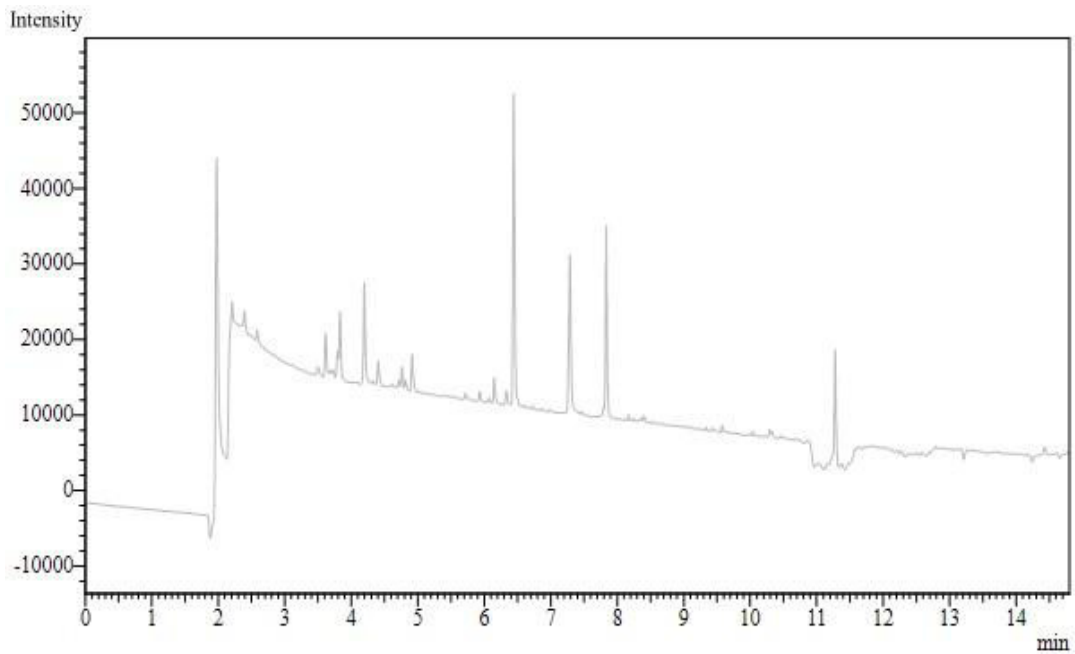
Fonte: a autora.

### Cromatograma da amostra 17:



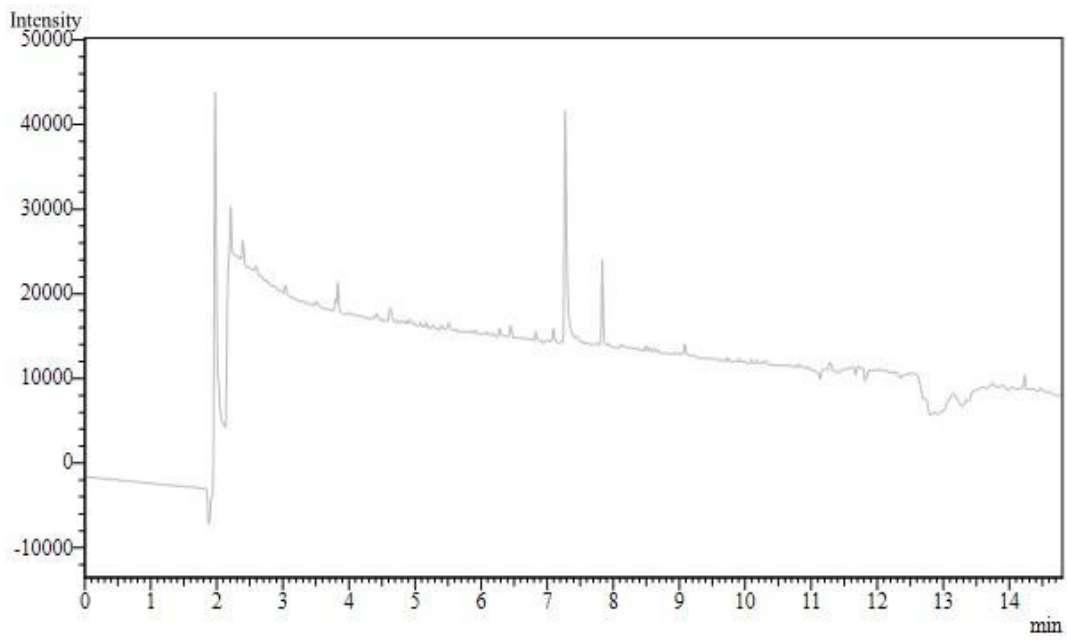
Fonte: a autora.

### Cromatograma da amostra 18:



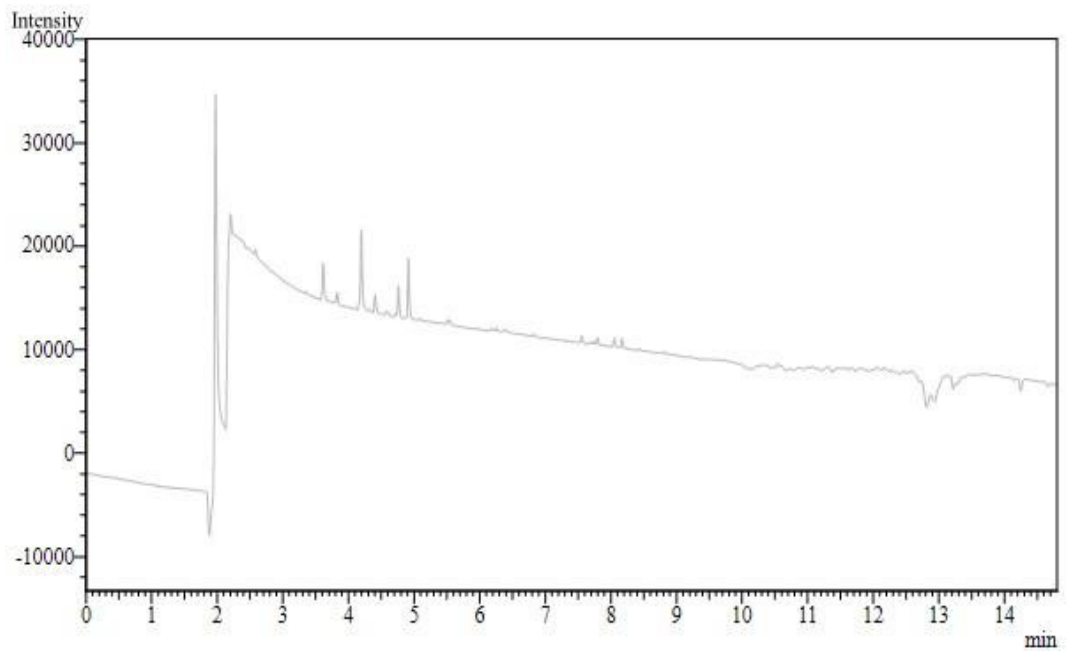
Fonte: a autora.

### Cromatograma da amostra 19:



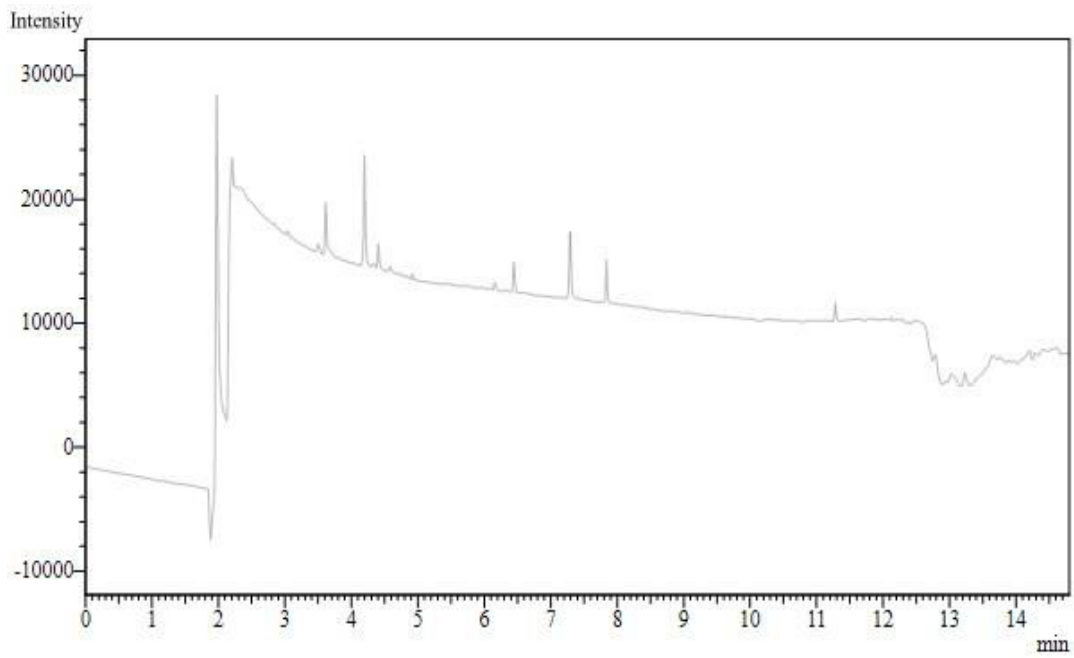
Fonte: a autora.

### Cromatograma da amostra 20:



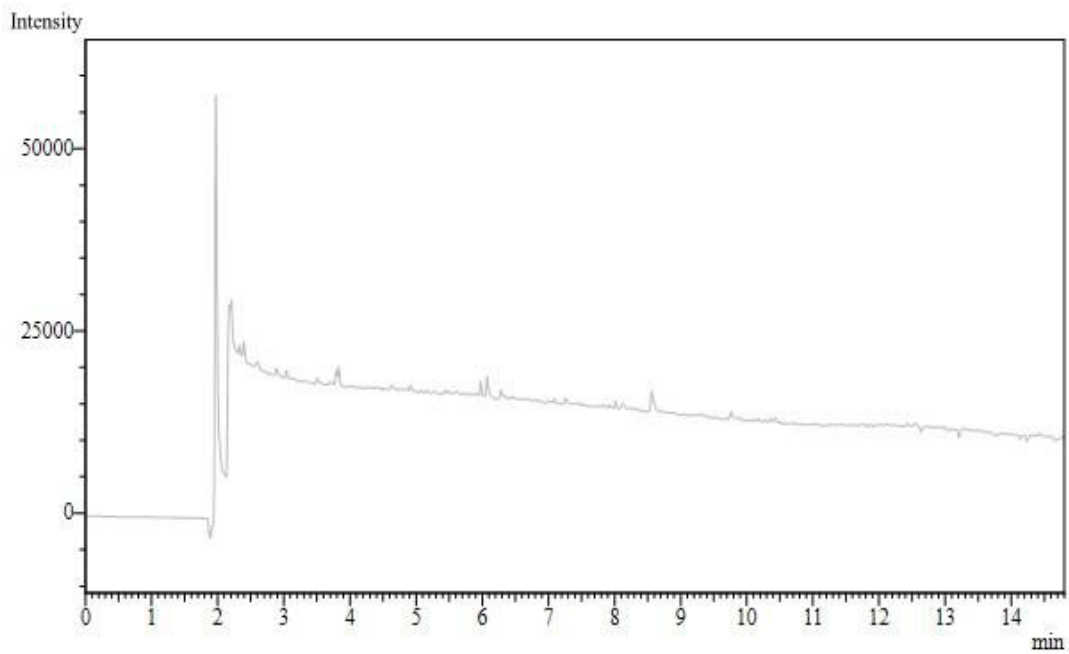
Fonte: a autora.

### Cromatograma da amostra 21:



Fonte: a autora.

### Cromatograma da amostra 22:

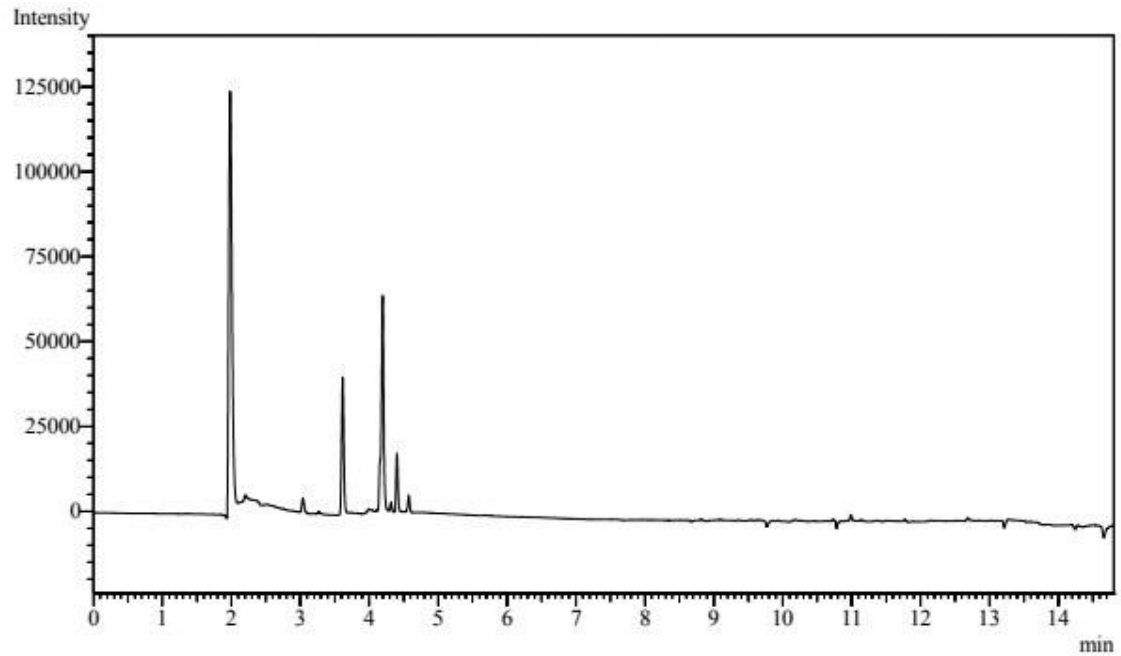


Fonte: a autora.

## Anexo 2:

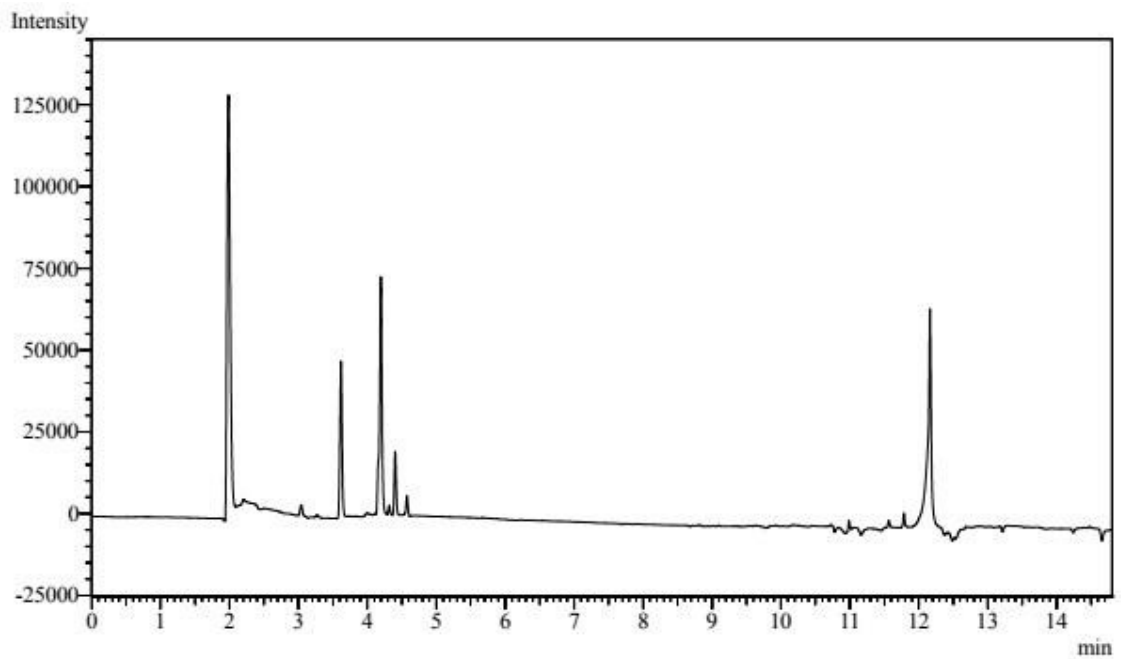
### Cromatogramas das amostras de embalagens

#### Cromatograma da embalagem da amostra de molho de pimenta



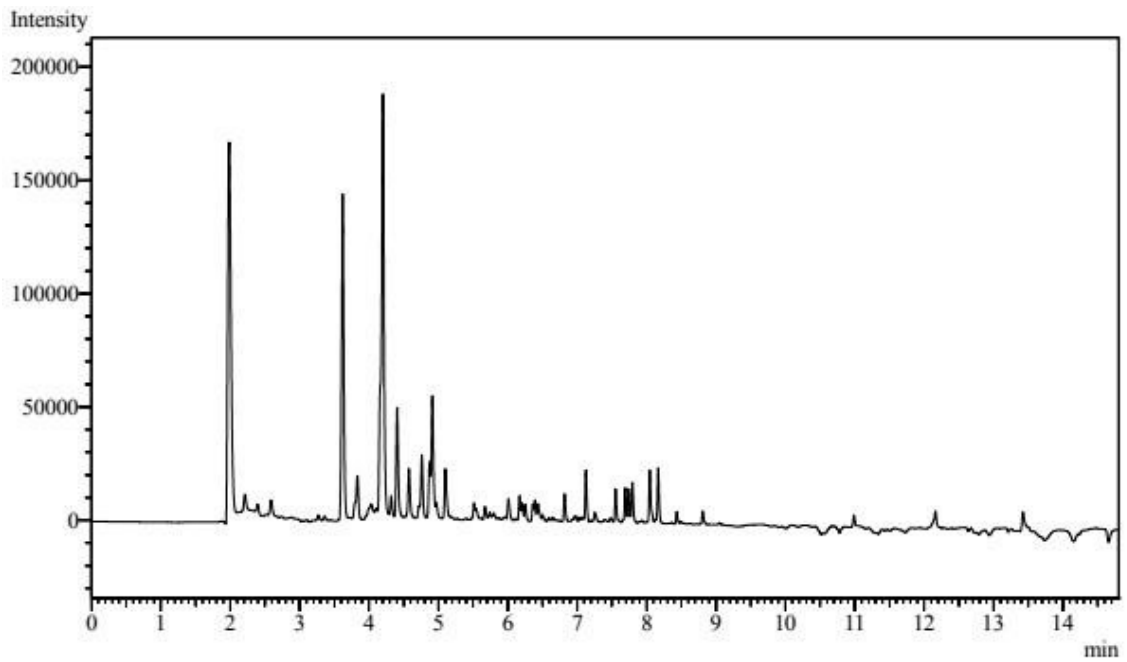
Fonte: a autora

#### Cromatograma da embalagem da massa de sêmola do tipo trigo duro



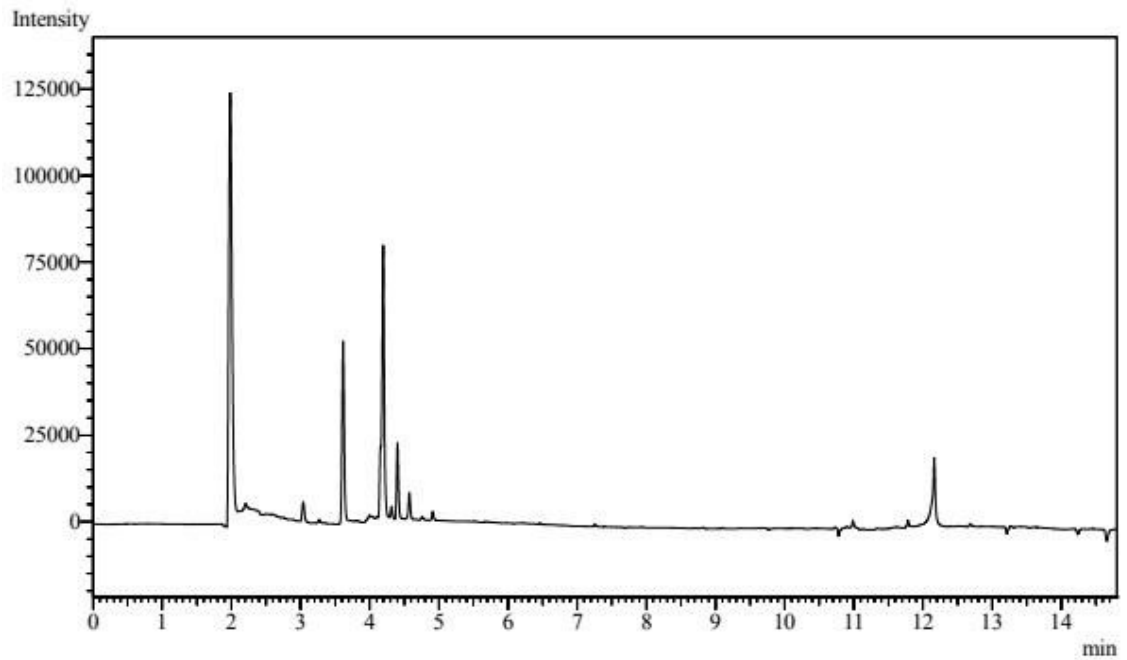
Fonte: a autora.

### Cromatograma da embalagem da massa de sêmola do tipo spaguetti



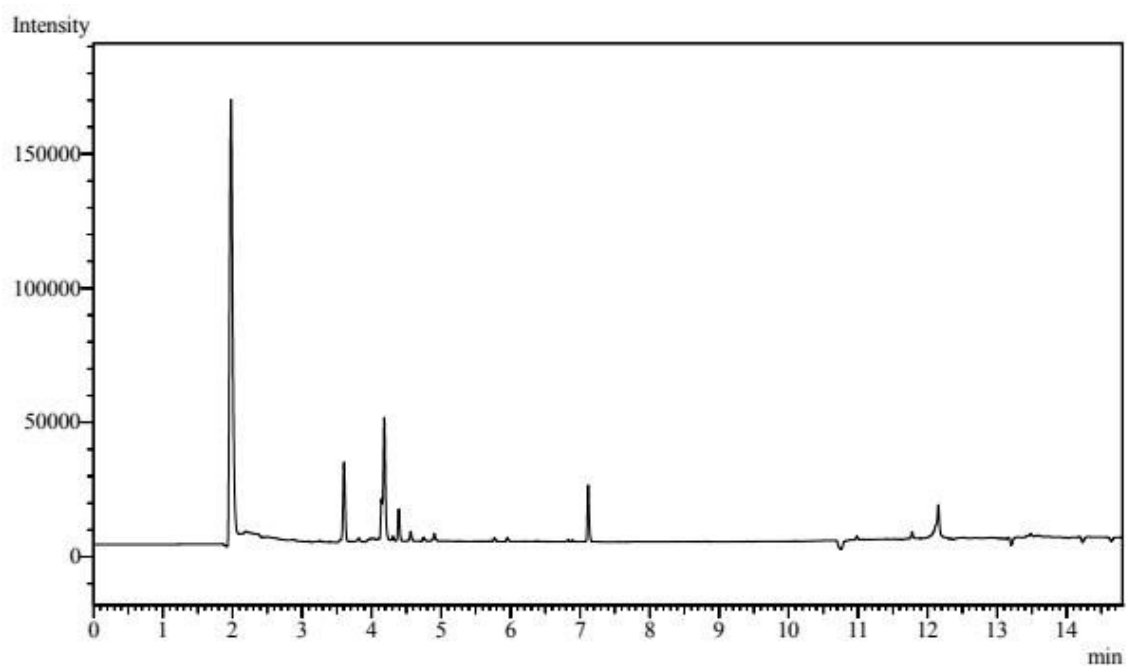
Fonte: a autora.

### Cromatograma da embalagem da amostra de azeitona preta desencaroçada



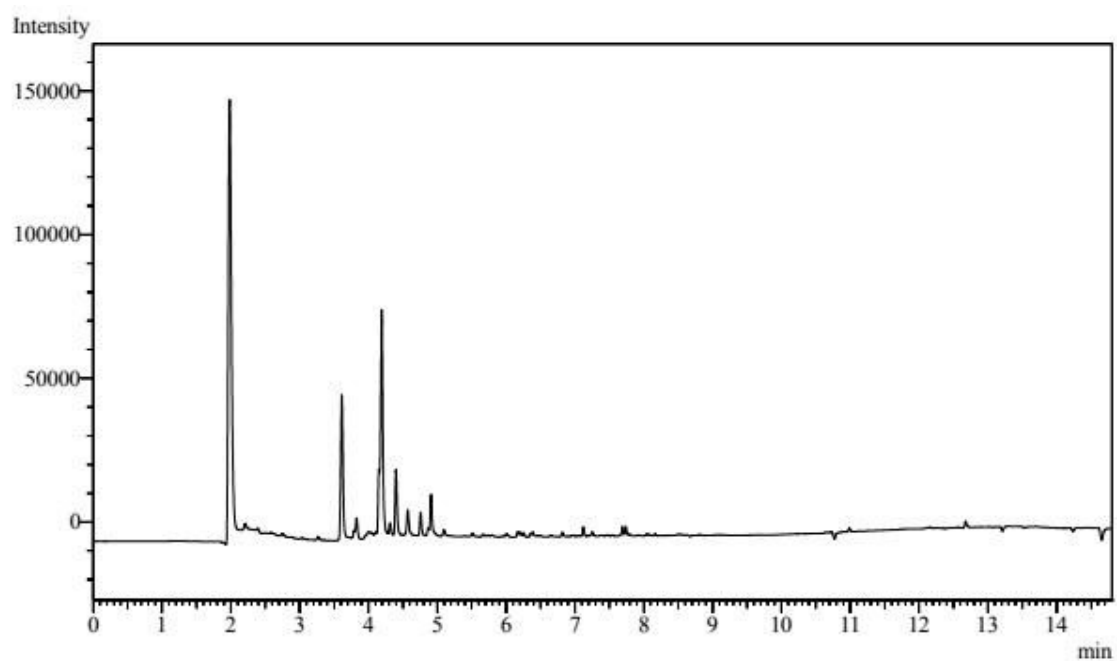
Fonte: a autora

### Cromatograma da embalagem da amostra de macarrão do tipo spaghetti



Fonte: a autora.

### Cromatograma da embalagem da amostra de arroz sasanishiki



Fonte: a autora.