Scientia Chromatographica

Revista Trimestral do Instituto Internacional de Cromatografia

2012 | Volume 4 | Número 1

IIC

AMPLIANDO OS LIMITES EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Força Extraordinária.
Performance Histórica.

INTRODUZINDO A NOVA FORÇA EM LC/MS/MS

Fotografe o código ou digite www.absciex.com/ampliandolimites no navegador de seu celular.

Para ler o QR code, você precisa ter um leitor de códigos 2D instalado em seu celular.

Laboratórios analíticos precisam de sistemas robustos de LC/MS/MS para obtenção de resultados confiáveis hora após hora, dia após dia. A nova série 4500 da AB SCIEX aproveita a histórica plataforma API 4000™ triplo quadrupolo e através de uma brilhante reengenharia estabelece uma nova referência para quantificação. E, com uma sensibilidade 10x maior que a dos triplo quadrupolos comerciais da mesma classe, a plataforma está cada vez melhor.

Também disponível com a tecnologia única QTRAP®, o 4500 atinge 100 vezes mais sensibilidade em modo de varredura MS/MS em comparação aos sistemas triplo quadrupolos comerciais, permitindo incomparável busca em bibliotecas espectrais e quantificação simultaneamente. Seja sua pesquisa focada em alimentos, triagem de contaminantes ambientais, pesquisa clínica, bioanálises ou proteômica quantitativa, o 4500 proporciona resultados robustos e definitivos com um novo nível de confiança.

Combinados em pacotes abrangentes para soluções completas que incluem sistemas de LC, softwares de aplicação e serviços de validação para fluxos de trabalho específicos qualquer que seja a aplicação, a série AB SCIEX 4500 irá muito além da própria força.

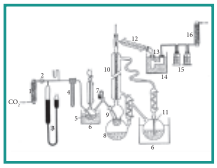
Veja como juntos podemos ampliar os limites em LC/MS/MS em www.absciex.com/ampliandolimites

AB SCIEX

© 2012 AB SCIEX. Os instrumentos da AB SCIEX são apenas para pesquisa científica. Não devem ser usados em procedimentos diagnósticos. As marcas registradas mencionadas aqui são de propriedade de AB Sciex Pte. Ltd. ou de seus respectivos proprietários.

SUMÁRIO

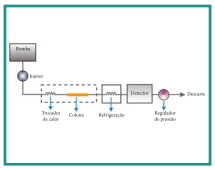
Editorial 5



PILARES DA CROMATOGRAFIA

Experimentos iniciais da cromatografia gás-sólido com desenvolvimento por eluição 7

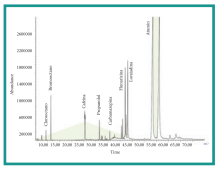
Carol H. Collins



HPLC-LC/MS

Efeitos de temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) 13

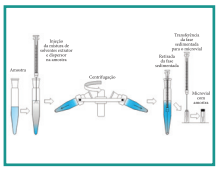
Fernando M. Lanças



GC-MS

GC-MS: herramienta fundamental para el análisis de drogas de uso ilícito 21

Elena Stashenko, Jairo René Martínez



PREPARO DE AMOSTRAS

Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações 35

Manoel Leonardo Martins, Ednei Gilberto Primel, Sergiane Souza Caldas, Osmar Damian Prestes, Martha Bohrer Adaime, Renato Zanella

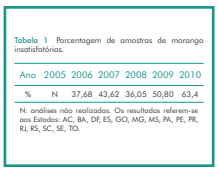


Tabela 1 Porcentagem de amostras de morango insatisfatórias.

Ano	2005	2006	2007	2008	2009	2010
%	N	37,68	43,62	36,05	50,80	63,4

N: análises não realizadas. Os resultados referem-se aos Estados: AC, BA, DF, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SE, TO.

HPLC

Morango: uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna 52

Daniele Oshita, Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Instituto Internacional de Cromatografia 77

Calendário Geral 78

Bookstore 80

Calendário de Cursos do I.I.C. 81

HRGC

Colunas para Cromatografia Gasosa
feitas no Brasil

Fases estacionárias:
NST-1, NST-5, NST-624, NST-1701, NST-50, NST-225, NST-100, NST-FFAP, NST-VOC, NST-BIS.

Comprimento:
Todos desde 1m até 100m.

Diâmetro Interno:
0,53mm; 0,32mm; 0,25mm; 0,22mm; 0,20mm; 0,18mm; 0,15mm; 0,10mm; 0,05mm.

Espessura de Filme:
Qualquer tamanho desde 0,01µm até 5,00µm.

Colunas Empacotadas:
Empacotamos colunas em aço inox e vidro com uma grande variedade de fases estacionárias, comprimentos e diâmetros internos.

Representantes Sudeste:
CMS Instrumentos Analíticos Ltda.
www.cmscientifica.com.br
TEL: 19 3812.9222
cms@cmscientifica.com.br
Cosmópolis SP - Brasil

Representantes Centro-Oeste:
JPChrom Com. de Prod. Lab. Ltda.
TEL: 61 8114.1800
junior.jpchrom@gmail.com
Brasília DF - Brasil

Demais Regiões:
www.nstonline.com.br
TEL: 16 3376.9914
info@nstonline.com.br
São Carlos SP - Brasil

nst
Nano Separation Technologies

EDITORIAL

Estamos nos aproximando da versão 2012 do Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas, COLACRO XIV, a ser realizado de 01 a 05 de outubro em Florianópolis, SC. A última versão do evento, ocorrida em 2008, no mesmo local, teve mais de 1.200 inscritos, mais de 700 posteres apresentados, 5 cursos de curta duração, 12 Simpósios Satélite, uma grande Exposição de Equipamentos e Assessórios, e várias apresentações de Seminários Técnicos organizados pelos Patrocinadores e Expositores do COLACRO. Em função destes fatos, o COLACRO foi considerado o maior evento do mundo naquele ano dedicado exclusivamente às técnicas cromatográficas e associadas. A organização do COLACRO XIV está programando um congresso ainda maior e com mais atrações, inclusive as famosas atividades noturnas as quais visam propiciar uma maior confraternização entre os congressistas. As inscrições com maior desconto já estão sendo efetuadas, e os primeiros trabalhos já foram recebidos. Consulte o website www.colacro.org e veja as novidades.

A Comissão Organizadora do COLACRO XIV cordialmente convida todos a se juntarem a nós e, mais uma vez, realizarmos o maior evento de cromatografia do mundo. Todos são muito bem vindos.

Fernando M. Lanças
Editor chefe

Galeria Parcial dos Convidados

Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas

Latin American Congress of Chromatography and Related Techniques

COLACRO XIV

Cursos Pré-Congresso • Simpósios Satélite • Palestras Plenárias • Pôsteres • Seminários Técnicos • Exposição

Short Courses • Satellite Symposia • Plenary Lectures • Poster Session • Technical Seminars • Exhibition

01-05 - Out, 2012

Florianópolis (SC), Brasil

INSCRIÇÕES E ENVIO DE RESUMOS

ABERTOS

Consulte www.colacro.org

Scientia Chromatographica 2012; 4(1):7-12
Instituto Internacional de Cromatografia
http://dx.doi.org/10.4322/sc.2012.001
ISSN 1984-4433

Experimentos iniciais da cromatografia gás-sólido com desenvolvimento por eluição

Carol H. Collins

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP,
Cep 13083-970, Campinas, SP, Brasil
e-mail: chc@iqm.unicamp.br

Resumo

Sistemas fechados e pressurizados para o manuseio de gases foram utilizados para a separação, identificação e, eventualmente, a quantificação de gases e compostos voláteis desde o início do século vinte, porém principalmente com desenvolvimento por deslocamento. Na década de 40 do século vinte, alguns pesquisadores realizaram alguns experimentos empregando o desenvolvimento por eluição, que logo foi usado para iniciar a cromatografia gás-sólido, ainda utilizado hoje.

Palavras-chave

História da cromatografia; cromatografia gasosa; cromatografia gás-sólido; desenvolvimento por eluição.

Early experiments with elution in gas-solid chromatography

Abstract

Pressurized systems to handle gases were used for separation, identification and, eventually, quantification of gases and volatile compounds from the beginnings of the 20th century, principally with displacement development. In the 40's of the last century, some researchers began to experiment with development by elution, which led to the start of the gas-solid chromatography still used today.

Keywords

History of chromatography; gas chromatography; gás-solid chromatography; elution development.

Nos anos iniciais do século vinte, a passagem de misturas de gases em sistemas fechados, pressurizados e com temperaturas controladas foi descrita por diversos pesquisadores, sendo que somente poucos destes reconheceram que o processo que eles descreveram foi o de cromatografia gás-sólido, com desenvolvimento por análise frontal, isto é, com aplicação contínua da amostra que também servia como fase móvel, ou por deslocamento, no qual uma substância com mais afinidade pela fase estacionária foi aplicada para forçar a amostra a andar através da coluna, sendo que o componente menos retido saia primeiro, seguido pelos próximos, em sequência até, no fim, sair o deslocador no final da análise[1]. Por outro lado, o processo de elui-

ção, descrito para a cromatografia líquido-sólido pelo russo M. S. Tswett em 1906[2], foi bem aceito por todos os pesquisadores que aplicaram esta técnica para suas separações, principalmente de compostos orgânicos menos voláteis, a partir da redescoberta da técnica na década de 1930[3]. Por que as separações com amostras gasosas ou vaporizadas não podem ser separadas com um fluxo de gás inerte? É provável que, novamente, as opiniões de um dos mais importantes físico-químicos alemães tinham influenciado muito esta ocorrência. O Professor Arnold Eucken (1884-1950) da Universidade de Göttingen sugeriu, em várias ocasiões, que o uso de um gás para eluição não seria possível, devido ao problema de difusão longitudinal que, ele pensava, induziria a reintegração de quaisquer componentes separados, não permitindo manter a separação das moléculas em moção rápida na fase gasosa. Este pensamento atrasou o desenvolvimento de cromatografia gás-sólido por eluição[4].

O primeiro grupo de pesquisa que aplicou eluição com um gás inerte em sistema fechado foi o do Professor Gerhard Hesse (1908-1997) (Figura 1). Hesse obteve seu doutorado em química orgânica (ênfase em produtos naturais) na Universidade de Munique em 1937, tendo participado dos experimentos que conduziram à implantação da cromatografia líquido-sólido nesta universidade, logo depois da sua "redescoberta" em Heidelberg pelo grupo de Kuhn[3]. Hesse iniciou sua carreira acadêmica na Universidade de Marburg/Lahn. Seus interesses nesta época focalizaram a determinação de ácidos e ésteres extraídos de diversas plantas e sua ferramenta preferida foi a cromatografia líquido-sólido. Por outro lado, os ácidos mais voláteis não foram retidos suficientemente na separação empregando esta técnica. Ele propôs o uso de uma fase móvel gasosa, menos interativa com a fase estacionária, entretanto, quando discutiu

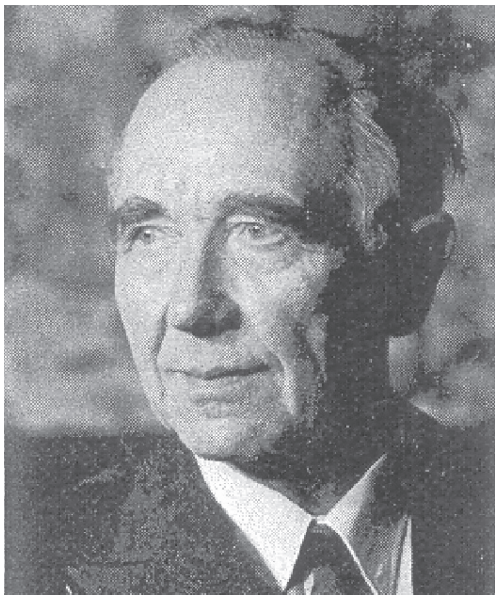


Figura 1 Foto de Gerhard Hesse.

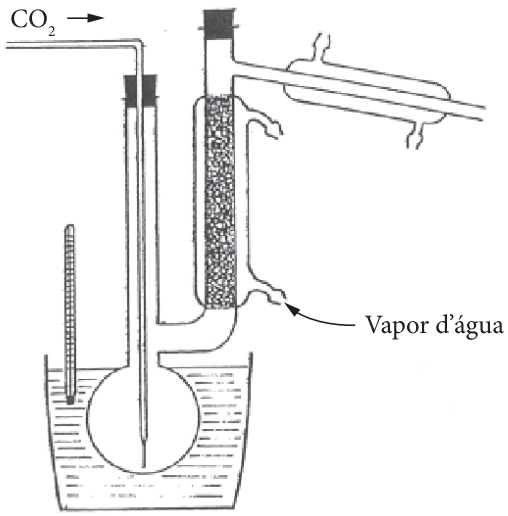


Figura 2 O primeiro sistema fechado utilizado por Hesse et al. para a cromatografia gás-sólido (modificado de Hesse et al.[6]).

esta ideia com colegas, as suas respostas foram negativas; citando o problema da difusão longitudinal na fase móvel gasosa.

Hesse decidiu fazer um experimento simples para verificar se a difusão apresentava os problemas levantados. Recheou uma coluna de vidro com amido, adicionou uma mistura de iodo e bromo no seu topo e, com a entrada fechada, passou um fluxo de nitrogênio através

da coluna. Logo se formaram duas bandas que se mantiveram separadas durante todo o experimento, uma de cor marrom (bromo) e outra azul (iodo), comprovando, pelo menos para Hesse, que cromatografia empregando uma fase gasosa inerte para eluição era viável[5].

Hesse e seus alunos montaram colunas de sílica, colocando a fase estacionária no centro de um condensador (Figura 2). A água ou outro líquido, circulando no condensador, aqueceu a coluna, quando desejado. A injeção foi realizada por destilação e a fase móvel usada foi dióxido de carbono. As substâncias eluídas foram coletadas em pequenos frascos resfriados para identificação e para determinações das suas propriedades físicas. Com este sistema, ele e seus alunos separaram alguns ésteres voláteis que não haviam sido separados por destilação, na ausência do recheio do condensador[6].

Uma vez comprovado que seu sistema simples, com gás de arraste para levar os componentes separados para o coletor de frações, funcionava, um novo sistema, incorporando os conceitos do anterior, entretanto muito mais reprodutível, foi construído (Figura 3). Com este sistema Hesse e Tschachotin[7] separaram substâncias com pontos de ebulição muito similares, misturas azeotrópicas, isômeros cis e trans de dicloroeteno, e diversos ácidos voláteis, saturados e insaturados. Tomaram a precaução de verificar que o aquecimento da coluna não induzia modificações na composição dos eluatos, não encontrando nenhum problema. Deve ser enfatizado que, neste trabalho[7], os autores descreveram seu novo método de separação como "uma modificação da análise por adsorção de Tswett", claramente reconhecendo o processo cromatográfico envolvido.

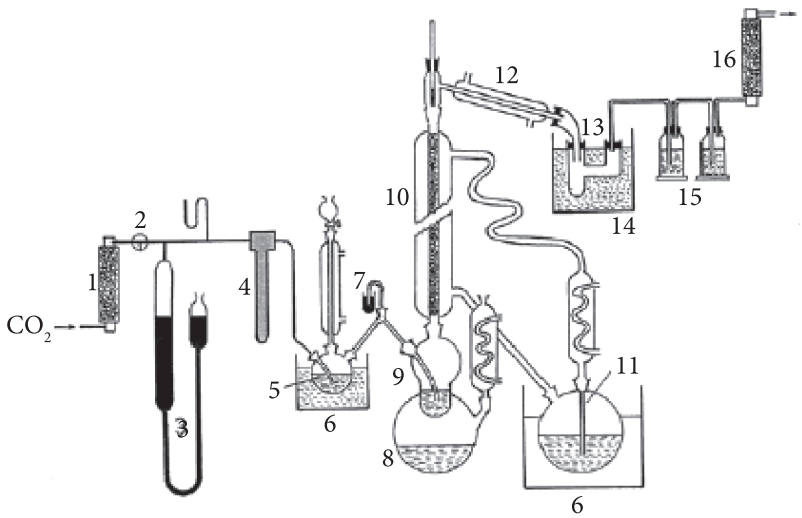


Figura 3 Outro sistema de cromatografia gás-sólido de Hesse et al. 1 = adsortivo para limpeza da fase móvel (CO_2); 2 = torneira de três vias; 3 = medidor de pressão de mercúrio; 4 = medidor da vazão da fase móvel; 5 = sistema para modificar a composição da fase móvel, quando desejado; 6 = banhos para controlar a temperatura; 7 = frasco com mercúrio, para controlar a pressão interna do sistema; 8 = sistema contendo vapores à temperatura constante; 9 = frasco com a amostra, que será volatilizada por aquecimento, para a injeção; 10 = coluna de separação, recheada com a fase estacionária; 11 = sistema para produzir os vapores utilizados para controlar a temperatura da coluna; 12 = condensador para condensar as frações voláteis separadas; 13 = sistema de aprisionamento das frações condensadas (trocado com frequência); 14 = frasco de resfriamento do sistema de aprisionamento; 15 e 16 = soluções e sólidos para absorver o gás de arraste e seus aditivos (modificada de Hesse et al.[7]).

Em 1943, Hesse foi chamado pelo exército alemão (ele participou na campanha contra a União Soviética durante a segunda guerra mundial) e, na volta, transferiu-se para a Universidade de Freiburg/Breisgau e, logo depois, para a Universidade de Erlangen/Nürnberg, onde estabeleceu um programa para treinamento de alunos e técnicos em diversas técnicas cromatográficas, incluindo as que utilizam gases com fases móveis.

Gerhard Damköhler (1908-1944) doutorou-se na Universidade de Munique em1931 e, depois de um período na indústria Linde, tornou-se assistente do Prof. Eucken em Göttingen. Em 1937, Damköhler transferiu-se para o Departamento de Engenharia Química do Instituto de Pesquisas da Força Aérea Alemã em Braunschweig, continuando suas pesquisas abordando reações rápidas em fase gasosa. Como parte destes estudos, Damköhler realizou experimentos envolvendo a separação de vapores de diferentes misturas de líquidos voláteis por adsorção-dessorção, utilizando nitrogênio como gás de arraste, um dispositivo para vaporizar a mistura líquida injetada e um detector por condutividade térmica. A Figura 4 mostra duas separações, entre várias, publicadas por ele[8,9]. Nestes trabalhos, Damköhler e Theile indicaram especificamente que o problema de difusão longitudinal não foi encontrado e que a cromatografia por adsorção de gases/vapores era um processo que merecia ser explorado.

Outro colaborador do Prof. Eucken, Ewald Wicke (1914-2000), continuou na Universidade de Göttingen após seu doutorado e, depois da morte do Prof. Eucken, em 1950, ocupou a cadeira dele, transferindo-se para a Universidade de Hamburgo em1954 e completando sua carreira na Universidade de Westphalia, em Munster, a partir de 1959. Wicke também realizou experimentos que indicaram que a difusão longitudinal poderia ser controlada, como indica a Figura 5. Atualmente, sabe-se que o objetivo deste estudo não foi obter separação e sim fazer uma comparação do comportamento de duas substâncias injetadas separadamente e misturadas. As

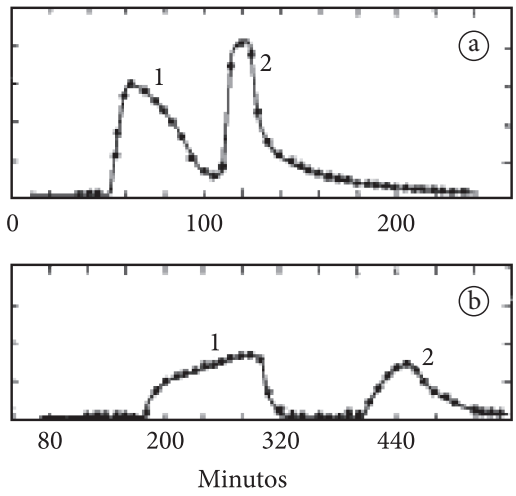


Figura 4 Alguns cromatogramas apresentados por Damköhler e Theile. A fase estacionária foi terra de pistoleiro e a fase móvel foi nitrogênio. O volume de injeção foi 0,1 mL da mistura líquida e o detector foi o de condutividade térmica. a: separação de metanol (1) e etanol (2) a 0 °C; b: separação de cicloexano (1) e benzeno a −40 °C (modificado de Damköhler et al.[8]).

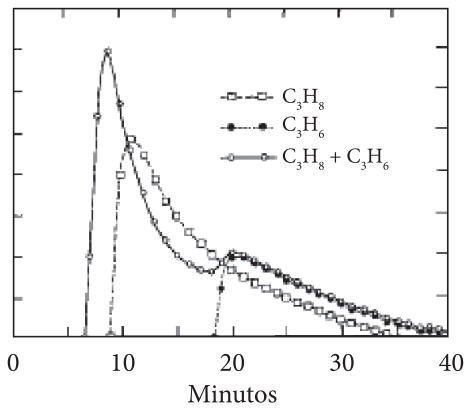


Figura 5 Cromatogramas obtidos por Wicke para propano (C_3H_8) e propeno (C_3H_6) injetados separadamente e misturados. Coluna: 57,5 cm × 4,2 mm; fase estacionária: bauxita granulada; fase móvel: ar a 60 mL/min; volume do gás injetado: 30 mL dos gases individuais e 60 mL da mistura 1:1 (v/v) (modificado de Ettre[4]).

duas substâncias mostraram comportamentos similares, quer injetadas individualmente, quer misturadas, isto é, a presença de um segundo componente não tem muito influência na adsorção-dessorção do primeiro componente[10].

Na década de 40 do século vinte, na Inglaterra, o pesquisador Eugene Glueckauf (1906-1982) aplicou a cromatografia gás-sólido a temperaturas baixas para a separação dos gases inertes produzidos pela fissão de urânio, especificamente criptônio e xenônio, como ferramenta para medir a eficiência de diferentes fontes de nêutrons que induziam a fissão. Em um congresso de cromatografia, organizado pela Sociedade Faraday em 1952, foi descrito o uso de 5 g de carvão pulverizado (diâmetro médio das partículas de 0,025 cm) como fase estacionária, em uma coluna de 20 cm e eluição com hidrogênio, inicialmente a –45 °C, para quantificar o criptônio, e depois a 50 °C para medir o xenônio[11]. A espectrometria de massas das frações separadas indicou a presença de menos de 0,1% de criptônio no xenônio coletado, comprovando a eficiência da separação. Ele aplicou uma equação para calcular o número de pratos da coluna, obtendo 500 pratos. O número de pratos aumentou quando a vazão do gás de arraste aumentou, sugerindo que a difusão longitudinal poderia ter um efeito em vazões baixas. Detalhes desta e de outras separações foram descritas alguns anos mais tarde[12], quando os resultados obtidos por vários pesquisadores, durante a Segunda Guerra Mundial, foram liberados para publicação.

Na União Soviética, alguns pesquisadores também realizaram experimentos empregando a cromatografia em fase gasosa inerte, na década de 50. Um destes experimentos foi feito pelo grupo de M.N. Turkeltaub, da Universidade de Moscou, que separou diversos hidrocarbonetos voláteis, utilizando uma coluna de sílica e ar como fase móvel. Colocaram a mistura em uma das extremidades da coluna e, após iniciar o fluxo de ar, aqueceram a coluna com um forno móvel, que passou lentamente do lado mais próximo ao local da aplicação da amostra até sua saída. Foi dado o nome "cromatotermografia" a esta técnica[13].

A década de 40 do século passado foi tumultuada, sendo a maior parte dela marcada pela Segunda Guerra Mundial. Sendo assim, revistas científicas não foram publicadas com regularidade ou tiveram suas publicações atrasadas. Além disso, a maioria não foi distribuída, exceto no local de publicação. Sendo assim, pesquisas realizadas nos países sob controle dos alemães não foram conhecidas nos países aliados, como os Estados Unidos e Grã-Bretanha (e Brasil) e vice-versa, até depois de 1946. A partir desta data, resultados científicos dificilmente foram comunicados entre o "Oeste" e os países sob controle da União Soviética. O resultado destas barreiras foram vários desenvolvimentos paralelos, sem que um grupo tivesse conhecimento dos trabalhos dos outros. Estes fatos influenciaram os anos iniciais da cromatografia gás-sólido, inclusive a construção de sistemas mais adequados para este fim, tópico a ser tratado no próximo capítulo.

Referências

1 Collins CH. Precursores da cromatografia gás-sólido. *Scientia Chromatographica* 2011; 3(4):281-288.

2 Collins CH. Michael Tswett e o "nascimento" da cromatografia. *Scientia Chromatographica* 2009; 1(1):1-21.

3 Collins CH. Químicos redescobrem a cromatografia líquido-sólido. *Scientia Chromatographica* 2009; 1(2):7-11.

4 Ettre LS. Early evolution of gas adsorption chromatography. Part I: Displacemnt development and the beginnings of elution-type investigations. *Chromatographia* 2002; 55:497. http://dx.doi.org/10.1007/BF02492283

5 Gerhard E. Hesse. In: "75 years of chromatography - a historical dialogue". Ettre LS, Zlatkis A, editors. Amsterdam: Elsevier; 1979. vol. 17, p. 131-140.

6 Hesse G, Eilbracht H, Reicheneder F. Das krystallisierte Calotropis-Harz. III. Mittreilung über afrikanische Pfeigifle. *Justus Liebig's Annalen der Chemie* 1941; 546:233. http://dx.doi.org/10.1002/jlac.19415460302

7 Hesse G, Tschachotin B. Adsorptionanalyse von Gasen und Dämpfen. *Naturwissenschaften* 1942; 30:387. http://dx.doi.org/10.1007/BF01475303

8 Damköhler G, Theile H. Stofftrennung durch Adsorption aus einem Hilfsgasstrom (Auszug). *Der Chemie* 1943; 56:353. http://dx.doi.org/10.1002/ange.19430565103

9 Damköhler G, Theile H. Güte der Sorptionverfahren zur Gastrennung (Auszug). *Der Chemie* 1943; 56:354. http://dx.doi.org/10.1002/ange.19430565104

10 Wilke E. Zur Zerlegung von Gasgemischen in durchströmter Adsorberschicht. *Angewandte Chemie* 1947; B19:15.

11 Glueckauf E. Discussion. *The Analyst* 1952; 77:903.

12 Glueckauf E, Kitt GP. The krypton and xenon contents of atmospheric air. *Proceedings of the Royal Society of London* 1956; A234:557.

13 Wintermeyer U. Historical review. In: Unger KK, editor. *Packings and Stationary Phases in Chromatographic Techniques*. New York: Marcel Dekker; 1990. cap. 1.

Recebido: 12/03/2012
Aceito: 21/03/2012

Scientia Chromatographica 2012; 4(1):13-19
Instituto Internacional de Cromatografia
http://dx.doi.org/10.4322/sc.2012.002
ISSN 1984-4433

Efeitos de temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Fernando M. Lanças

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo – USP,
Cep 13560-970, São Carlos, SP, Brasil
e-mail: flancas@iqsc.usp.br

Resumo

Ao longo de várias décadas, a principal característica que diferenciava claramente a Cromatografia Gasosa (GC) da Cromatografia Líquida (LC) era o fato de que a separação em GC usualmente ocorria em temperaturas elevadas, enquanto que a LC ocorria à temperatura ambiente. Entretanto, com o desenvolvimento das colunas quimicamente ligadas (ex. RP-18), mecanismos de separação mais dependentes da temperatura começaram a ser empregados e o controle de temperatura para assegurar a precisão dos tempos de retenção passou a ser utilizado também em LC. Mais recentemente, verificou-se que o uso de temperatura mais elevada em LC conduz a uma série de vantagens quando comparado às separações efetuadas à temperatura ambiente, resultando em um nicho denominado de Cromatografia Líquida a Elevadas Temperaturas (ETLC, "*Elevated Temperature Liquid Chromatography*") ou Cromatografia Líquida em Altas Temperaturas (HTLC, "*High Temperature Liquid Chromatography*"). O presente trabalho apresenta uma visão geral a respeito do papel da temperatura em cromatografia líquida, especialmente em relação a sua influência na seletividade e retenção.

Palavras-chave

Cromatografia Líquida a Altas Temperaturas; HTLC; Cromatografia Líquida em Temperaturas Elevadas; ETLC; Efeitos da temperatura em HPLC.

Temperature Effects in High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Abstract

For several decades the major characteristics to clearly diferentiate gas chromatography (GC) from liquid chromatography (LC) has been the fact that most GC separation occurred at elevated temperatures while LC usually has been performed at room temperature. However, upon the development of chemically bonded phases (ex. RP-18), more temperature dependent separation mechanisms started to be used, and the temperature control became an important issue to control the retention times. More recently it was observed that the use of elevated temperatures in LC broughth several advantages over the same separations performed at room temperature thus starting a new area termed ETLC (Elevated Temperature Liquid Chromatography) or HTLC (High Temperature Liquid Chromatography). This paper presents an overview on the role of the temperature in LC, in special about its influence on both selectivity and retention.

Keywords

High Temperature Liquid Chromatography; HTLC; Elevated Temperature Liquid Chromatography (ETLC); ETLC; Temperature effects in HPLC.

1 Introdução

O controle da temperatura em cromatografia líquida não tem ainda recebido o merecido respeito e atenção, mesmo sabendo-se há décadas que a temperatura influencia fortemente parâmetros como solubilidade, difusividade, polaridade e viscosidade da fase móvel. Recentemente tem aumentado significantemente o número de trabalhos publicados a respeito do potencial de melhorar-se a resolução cromatográfica, através de um aumento na seletividade ou na eficiência, fatores dependentes da temperatura. Em temperaturas mais elevadas, a viscosidade é reduzida e a velocidade de difusão aumenta, fazendo com que a velocidade de transferência de massa entre a fase estacionária e a fase móvel seja aumentada e com ela a eficiência, tornando possível diminuir substancialmente o tempo de análise. O efeito da temperatura na retenção cromatográfica tem sido exaustivamente estudado recentemente, em especial sistemas baseados em fase reversa[1-5]. Apesar disto, o controle de retenção através da temperatura tem também sido estudado para outros sistemas, incluindo troca iônica, interações hidrofílicas e fase normal[6]. Mesmo considerando as vantagens apresentadas pelo uso de temperaturas elevadas em LC, um dos fatores limitantes deste enfoque é a estabilidade das fases estacionárias mais comumente empregadas.

Este trabalho discute, de forma crítica, as vantagens e limitações do uso da temperatura elevada em cromatografia líquida.

2 Efeitos da temperatura na seletividade

A influência da temperatura (T) no fator de capacidade (k) é usualmente expressa através da equação de Van't Hoff (Equação 1):

$$ln\,k = -\left(\Delta H^{\circ}/\,RT\right) + \left(\Delta S^{\circ}/\,R\right) + ln\,\emptyset \qquad (1)$$

onde: ΔH° = Entalpia do sistema; ΔS° = Entropia do sistema; T = Temperatura absoluta (°K); R = Constante universal dos gases (8,31441 $J.K^{-1}mol^{-1}$); k = Fator de retenção; Ø = Razão do volume entre a fase estacionária e a móvel (também representado por β).

Esta relação mostra que, para uma mesma mudança na temperatura, o fator de retenção para solutos com maior ΔH é mais afetado do que para solutos com menor valor de ΔH, fornecendo diferentes seletividades em diferentes temperaturas. Assim, uma mudança na temperatura pode permitir uma separação entre solutos, que não seria obtida empregando-se a temperatura originalmente utilizada. Entretanto, o efeito da temperatura na retenção é pequeno quando comparado com um aumento na força do solvente de eluição. Estudos com diferentes eluentes e faixas de temperatura sugerem que um aumento de 5 °C na temperatura corresponde a um aumento de 1% de acetonitrila na fase móvel em fase reversa. A relação linear existente entre k e 1/T, amplamente estudada em fases reversas empregando distintas condições, tem sido igualmente observada para separações em fase normal e até mesmo em cromatografia de troca iônica.

Apesar de que a seletividade em LC pode ser modificada através de vários parâmetros (fase estacionária, fase móvel, pH, natureza do solvente orgânico, dentre outros), a temperatura até recentemente tem sido negligenciada como parâmetro de controle de seletividade. Com o surgimento de fornos tecnologicamente mais adequados para LC e o barateamento do seu valor, acredita-se que em breve a modificação de seletividade da separação através de modificação (geralmente aumento) da temperatura será mais popular. Deve ser lembrado que este é um dos parâmetros mais fáceis de ser ativado e controlado, usualmente através do *software* ou no painel do instrumento.

3 Temperatura *vs.* eficiência *vs.* resolução

A resolução (R_s) em cromatografia é comumente expressa através da equação conhecida como Equação Mestra da Resolução ("*Resolution Master Equation*") ou Equação de Purnell (Equação 2):

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \times \left(\frac{k}{1+k}\right) \quad (2)$$

onde: R_s = resolução; N = número de pratos (eficiência); α = fator de separação (k_2/k_1); k = fator de retenção.

Os 3 termos da equação são interdependentes; por exemplo, pequenas mudanças em k geralmente ocasionam mudanças em α e, portanto, mudanças significativas na resolução. Uma vez que a resolução é aumentada com o aumento dos valores N, α e k, qualquer fator que possa alterar estes parâmetros poderá melhorar R_s. A temperatura afeta todos eles e, consequentemente, a resolução.

Yang[7] estudou recentemente o efeito da temperatura na eficiência das colunas (N) operando em diferentes faixas de temperaturas, concluindo que a temperatura de análise em LC operando em fase reversa pode ser otimizada para maximizar N. Em temperaturas mais baixas, o tempo de transferência de massas na equação de van Deemter determina a altura do prato (H), e em temperaturas mais elevadas o termo correspondente à difusão longitudinal determina a altura do prato. Assim, operando sob velocidade linear constante, a altura do prato diminui com o aumento da temperatura em baixas temperaturas e aumenta com o aumento da temperatura em temperaturas elevadas. Outra conclusão do trabalho foi que, empregando-se elevadas temperaturas em LC, deve-se usar vazões (fluxos) elevadas da fase móvel de maneira a manter valores baixos de H e, consequentemente, valores elevados de N e R_s.

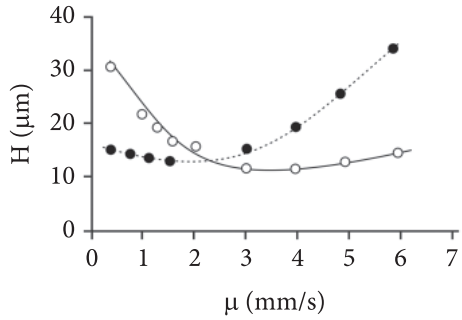


Figura 1 Variação da eficiência (medida com altura equivalente a um prato, H) em função da velocidade linear media (*µ*). [●] = 34 °C[o] = 135 °C.

Esta relação é ilustrada na Figura 1, a qual mostra um estudo realizado variando-se a velocidade linear média da fase móvel e o valor da altura do prato resultante H. A temperatura mais baixa (linha interrompida), valores baixos de H, e consequentemente altos de N, são obtidos somente em baixas velocidades lineares, até 2 mm/s. A partir desde ponto, o aumento da velocidade linear da fase móvel acarreta acelerado aumento de H, com diminuição acentuada de N. Isto não é observado a elevadas temperaturas (linha não interrompida), em que claramente se observa que o valor de H se mantém praticamente inalterado a partir de 2 mm/s. Este fator tem influência na velocidade da análise, fator discutido na próxima seção.

4 Temperatura *vs.* tempo de análise

Uma das principais maneiras práticas para reduzir o tempo de análise em HPLC é o uso de colunas mais curtas. Entretanto, o comprimento da coluna é um dos principais parâmetros que afeta a eficiência da separação (Equação 3), uma vez que:

$$N = \left(\frac{L}{H}\right) \quad (3)$$

ou seja, o número de pratos N é diretamente proporcional ao comprimento da coluna L e, assim, alguma forma de compensação por esta perda precisa ser encontrada no caso de uma redução em L. Atualmente, uma delas é a diminuição no tamanho das partículas de fase estacionária, dp, uma vez que N α 1/dp, ou seja, diminuindo-se o tamanho das partículas, aumenta-se a eficiência (N) da coluna. Entretanto, a diminuição do tamanho das partículas, dp, apresenta como principal desvantagem um aumento significativo na pressão do sistema (Equação 4), uma vez que:

$$\Delta P = \frac{\emptyset Ln}{100} . \frac{1}{dp} \qquad (4)$$

onde: ΔP = variação da pressão na coluna (diferença entre a pressão na entrada e na saída); n = viscosidade da fase móvel; dp = diâmetro médio das partículas.

Este aumento da pressão, especialmente no caso do uso de fases estacionárias contendo partículas com dp <3 μm, faz com que o limite de segurança dos equipamentos de HPLC convencionais seja facilmente atingido. Em função destas variáveis, surgiu recentemente no mercado um novo enfoque para contornar estas limitações denominado U-HPLC (Cromatografia Líquida a Pressões Ultraelevadas) ou UPLC (Cromatografia Líquida com Ultradesempenho).

Por outro lado, especialmente em fase reversa, um aumento de temperatura ocasiona uma diminuição na retenção dos analitos. Além disso, a diminuição na viscosidade da fase móvel em temperaturas elevadas provoca uma diminuição na pressão do sistema, permitindo o uso de vazões (fluxos) maiores, mesmo em equipamentos "convencionais" (não U-HPLC). Assim, em temperaturas mais elevadas, torna-se possível o uso de colunas contendo partículas de diâmetro médio inferior a 3 μm em equipamentos convencionais de HPLC, reduzindo substancialmente os tempos de análise.

5 Temperatura *vs.* química verde

Em LC, especialmente no modo fase reversa, o aumento de temperatura ocasiona uma redução na retenção dos analitos. Apesar dos benefícios mais óbvios serem uma redução no tempo de análise e na pressão do sistema, outro fator importante é que a quantidade de modificador orgânico na fase móvel pode ser reduzida de forma significativa. Em casos especiais, em temperaturas mais elevadas, é possível eliminar-se completamente o solvente orgânico, transformando a fase móvel em água pura. Outro fator interessante é que a redução da pressão no sistema permite o uso de etanol no lugar de metanol ou acetonitrila, amplamente usados como solventes orgânicos para fases móveis. Uma vez que o Brasil é um grande produtor de etanol, seu uso traria uma alternativa interessante quando da escassez de acetonitrila no mercado nacional, como ocorrido recentemente. Assim, os principais eluentes utilizados em fase reversa, modo mais utilizado em HPLC, passariam a ser etanol e alguns solventes não tóxicos mais baratos e de grande disponibilidade no Brasil. Este enfoque estaria em total acordo com o enfoque atual denominado química verde (*green chemistry*).

6 Temperatura *vs.* detectabilidade

Conforme discutido, o aumento da temperatura em LC permite uma diminuição na quantidade de solvente orgânico na fase móvel, especialmente em fase reversa. Neste caso, a fase móvel poderá ser constituída por água pura, solvente este que apresenta maior transparência na região UV, permitindo uma melhor exploração da região do espectro ao redor de 190 mm, onde vários compostos apresentam sinal analítico, mas não são investigados por problemas de absorção dos eluentes orgânicos, ou suas impurezas, nesta região. Adicionalmente, o uso de outros

detectores como FID (detector por ionização de chama) torna-se mais fácil e o controle de ionização em espectrometria de massas, mais preciso. Além disso, o aumento da temperatura em LC tem também demonstrado um efeito benéfico na forma dos picos, diminuindo a exigência de eluentes que, muitas vezes, requerem valores de pH e força iônica, os quais agridem as fases estacionárias empregadas nas colunas.

7 Algumas limitações práticas do uso de temperaturas elevadas em LC

Um dos problemas encontrados em cromatografia líquida em temperaturas elevadas é a estabilidade térmica tanto da fase estacionária quanto dos compostos a serem analisados. A maior parte das fases estacionárias utilizadas em HPLC tem como base a sílica (ex: C-18, C-8, Amino, Ciano e outras) e são estáveis até aproximadamente 60 °C; em condições excepcionais, algumas fases possuem estabilidade até próximo de 100 °C[8].

O grande problema nestes casos é que o uso de água na fase móvel, associado a temperaturas elevadas, favorece a ocorrência de hidrólise e, consequentemente, perda da fase quimicamente ligada. Jones e colaboradores mostraram a existência de fases estáveis à base de sílica, as quais são estáveis até 200 °C operando em fase reversa[9].

A Tabela 1 ilustra as primeiras fases comercialmente disponíveis em HPLC.

Detalhes destas e de outras colunas podem ser encontrados em revisão de Yang, exclusivamente a respeito de fases estacionárias para HTLC[10].

A estabilidade térmica dos compostos em análise é outra preocupação com esta técnica, uma vez que serão empregadas temperaturas usualmente muito superiores às usadas em HPLC. Alguns fatores devem ser considerados, neste caso. Em geral a estabilidade térmica dos compostos obtida por outras técnicas, e em outras condições (ex. métodos térmicos), é muito maior no ambiente cromatográfico, mais inerte.

Escolhendo-se a coluna apropriada e o material de empacotamento o mais inerte possível (resíduo de metais na fase estacionária é crítico neste caso), além de colunas curtas para eluição mais rápida, estende-se bastante a estabilidade térmica das substâncias.

O uso de temperaturas elevadas em LC requer algumas modificações na instrumentação regularmente utilizada em HPLC. Uma delas é o

Tabela 1 Primeiras fases comercialmente disponíveis para cromatografia líquida a temperaturas elevadas.

Empresa	Material	Nome da coluna	Fase estacionária	Temp. máxima (°C)
Hamilton	DVB*	PRP-1	PS-DVB	150
Jordi	DVB*	Jordi RP	DVB	150
Polymer labs	DVB*	PLRP-S	PS-DVB	150
Selerity	Sílica polidentada	Blaze-200	C-18	200
Shimadzu	Sílica encapsulada	Pathfinder	C18	200
Supelco	Óxido de Zircônio	Discovery	PBD, PS	150
Supelco	Óxido de Zircônio	Discovery	Carbono C18	150
Thermo	Carbono grafitizado	PRP-1	Carbono grafitizado	200

* PS = Poliestireno. DVB = Divinilbenzeno.

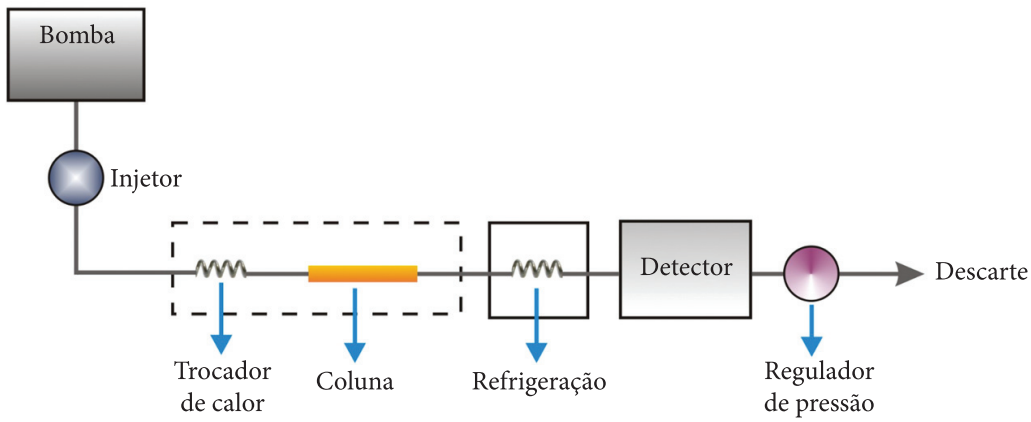


Figura 2 Instrumentação típica utilizada em Cromatografia Líquida em Alta Temperatura (HT-LC).

uso de metal, ao invés de PEEK em toda a instrumentação, e conexões sujeitas ao contacto com a temperatura elevada.

A Figura 2 ilustra um arranjo típico para HTLC.

A fase móvel é mantida no estado líquido através do regulador de pressão instalado após o detector, enquanto que um trocador de calor antes da coluna evita diferenças entre a temperatura eluente que entra no forno e quando atinge a coluna, evitando alargamento dos picos. Em algumas situações particulares, é comum instalar-se um trocador de calor antes da coluna em separações envolvendo necessidade de desnaturação.

8 Programação de temperatura em LC

Enquanto que em cromatografia gasosa (GC) a temperatura é a variável mais relevante, e em cromatografia com fluido supercrítico (SFC), importante, seu uso em cromatografia líquida tem sido negligenciável. Este fato tem sido atribuído a dois fatores principais: a crença sobre a baixa estabilidade dos analitos e das colunas em temperaturas elevadas. Estes argumentos já foram discutidos no item anterior, concluindo-se que a estabilidade térmica de ambos é muito superior ao que se imaginava, e que as fases estacionárias e instrumentos mais modernos operam em elevadas temperaturas sem provocar os efeitos de decomposição indesejáveis.

Considerando-se o fato de que a temperatura influência a viscosidade, solubilidade, difusividade e pressão de vapor em LC, sem dúvida ela apresenta importante contribuição na retenção, seletividade, eficiência e resolução. A partir desta constatação, vários trabalhos têm sido publicados sobre a escolha de uma temperatura ideal (isotérmica), para análises complexas por HPLC, enquanto que a otimização da separação é, geralmente, feita através do gradiente de fase móvel. Resultados mais recentes indicam que, ao invés de fixar-se a temperatura durante toda a análise, o uso de programação de temperatura permite resultados similares aos obtidos empregando-se este enfoque em cromatografia gasosa. Uma solução ainda mais interessante é a composição de programação de temperatura e de fase móvel (gradiente), o que permite a obtenção de separações melhores, em tempo menor.

Um próximo trabalho nesta série sobre os efeitos da temperatura em LC focalizará especificamente a programação de temperatura em cromatografia líquida (TPLC).

9 Conclusões

O uso de temperaturas elevadas (na faixa entre 60 e 200 °C) abre novas perspectivas para a otimização de métodos complexos em HPLC. O aumento da temperatura diminui a viscosidade da fase móvel, permitindo uma redução no tempo de análise sem perda de eficiência da coluna devido à melhora na transferência de massa entre a fase móvel e a fase estacionária. Como resultado, pode-se operar em velocidades lineares acima da considerada ótima à temperatura ambiente, com ganho na eficiência de separação e minimização do tempo de análise.

Como decorrência destes fatos, a programação de temperatura da fase móvel, antes restrita à cromatografia gasosa, é uma nova realidade já disponível comercialmente (apesar de que ainda pouco empregada no momento) para ser integrada no arsenal de ferramentas do usuário da HPLC.

Referências

1 Teutenberg T. Potential of high temperature liquid chromatography for the improvement of separation efficiency - A review. Analytica Chimica Acta 2009; 643:1-12. PMid:19446057. http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.008

2 Yang Y. Subcritical water chromatography: A green approach to high-temperature liquid chromatography. Journal of Separation Science 2007; 30(8):1131-1140. PMid:17595948. http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200700008

3 Teutenberg T, Tuerk J, Holzhauser M, Giegold S. Temperature stability of reversed phase and normal phase stationary phases under aqueous conditions. Journal of Separation Science 2007; 30(8):1101-1114. PMid:17595945. http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200600507

4 Teutenberg T. High temperature liquid chromatography - A brief review about an emerging technique. Chromatography Today 2010; 3(3):3-6.

5 Zhun C, Goodall D, Wren S. Elevated temperature HPLC: principles and applications to small molecules and biomolecules. LCGC Asia Pacific 2005; 8(1):48-59.

6 Lundanes E, Greibrokk T. Temperature effects in liquid chromatography. Advances in Chromatography 2006; 2:45-77.

7 Yang Y. A model for temperature effect on column efficiency in high-temperature liquid chromatography. Analytica Chimica Acta 2006; 558:7-10. PMid:17386578. http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.011

8 Vanhoenacker G. Elevated temperature and temperature programming in conventional liquid chromatography – fundamentals and applications. Journal of Separation Science 2006; 29(12):1822-1835. PMid:16970186. http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200600160

9 Jones A, Marin S, Clark J, Porter N. In: Proceedings of the XXIX International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques; 2005; Stockholm. Stockholm; 2005. p. 3-30.

10 Yang Y. Stationary Phases for LC Separations at Elevated Temperatures. LCGC North America 2006; 24(S4):53-58.

Recebido: 08/03/2012
Aceito: 22/03/2012

A Shimadzu apresenta a nova geração de Sistemas para Cromatografia Líquida:

Nexera

Ultra High Performance Liquid Chromatograph

O Sistema Nexera UHPLC combina a necessidade atual de aumento de produtividade através de análises ultra-rápidas e com alta resolução, sem comprometer o desempenho e a robustez do sistema.

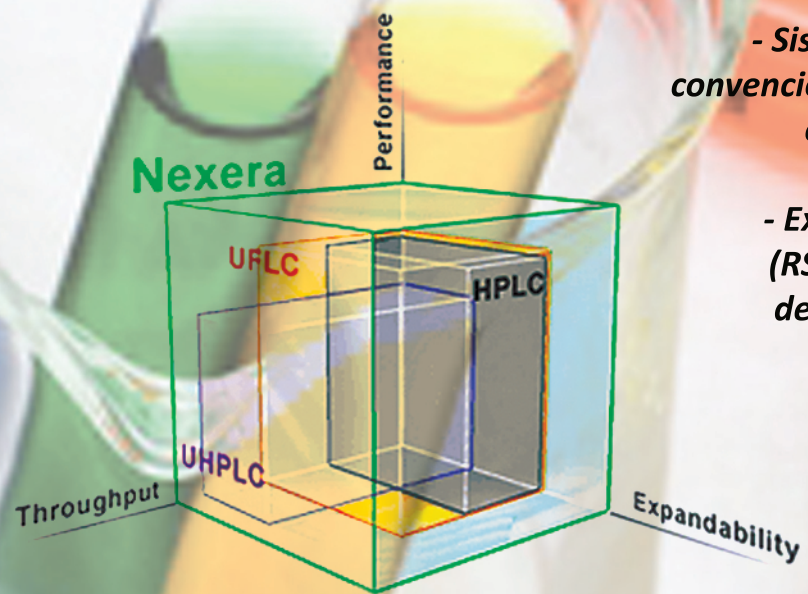
Características Principais:

- Intervalo de pressão: 130 MPa (<3mL/min), 80 MPa (<5mL/min) e 22 MPa (<10mL/min);

- Sistema Modular Flexível (sistema micro, convencional, com ultra alta pressão, isocrático ou gradiente ternário de alta pressão);

- Excelente precisão de volume de injeção (RSD 0,25%), carryover (0,0015%), tempo de injeção (10s), injeção de amostra com volume total ou injeção usando loop, linearidade (2,5 AU), volume morto do sistema (150 uL);

-Green Chromatography (OPCIONAL): temperatura do forno de coluna operando até 150ºC



SHIMADZU

SCIENTIFIC INSTRUMENTS CO.
SINC DO BRASIL
INSTRUMENTAÇÃO CIENTÍFICA LTDA

Scientia Chromatographica 2012; 4(1):21-33
Instituto Internacional de Cromatografia
http://dx.doi.org/10.4322/sc.2012.003
ISSN 1984-4433

GC-MS: herramienta fundamental para el análisis de drogas de uso ilícito

Elena Stashenko*, Jairo René Martínez

Centro de Investigación de Excelencia – CENIVAM, Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas – CROM-MASS, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander – UIS, Bucaramanga, Colombia
e-mail: elena@tucan.uis.edu.co

Resumo

La determinación cromatográfica de drogas de uso ilícito presenta retos importantes en varias etapas de la cadena analítica debido a la volatilidad relativamente baja de los analitos, a la diversidad grande de los posibles contaminantes y a las concentraciones bajas en las que se encuentran algunas sustancias de interés. La preparación de la muestra, el uso de agentes de derivación, los modos de operación del espectrómetro de masas para la detección y los diversos campos de aplicación del análisis GC-MS de sustancias controladas se discuten en este artículo junto con la presentación de algunos ejemplos recientes de estas aplicaciones.

Palavras-chave

Cromatografía de gases; cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas; sustancias controladas; drogas.

GC-MS: fundamental tool for the analysis of drugs of illicit use

Abstract

The chromatographic determination of illicit drugs poses important challenges at various stages along the analytical procedure, due to the low volatility of the analytes, the diversity of potential contaminants, and to the low concentrations of certain substances of interest. Sample preparation, the use of derivatization agents, different operating modes of the mass spectrometer for the detection, and the diverse application fields of the GC-MS analysis of illicit drugs are discussed in this article together with the presentation of some examples of these applications.

Keywords

Gas chromatography; gas chromatography-mass spectrometry; controlled substances; drugs.

1 Introducción

Las drogas de uso ilícito, consumidas con el propósito final de alterar el estado de conciencia o percepción, forman parte de las llamadas *sustancias controladas*, cuyo análisis confiable es muy importante en diferentes ramas de la ciencia, por ejemplo, en medicina, toxicología, control de *doping*, asuntos legales (ciencias forenses), pruebas para empleo o supervisión laboral, accidentes

de tránsito, programas de rehabilitación, entre otras áreas. Existen diferentes escenarios posibles, cuando se necesita determinar la presencia de sustancias ilícitas (drogas) y cuantificarlas. Se han desarrollado diferentes protocolos de análisis (muestreo, extracción, determinación cualitativa y cuantitativa) de estas sustancias, que se encuentran tanto en forma (relativamente) pura (*e.g.*, clorhidrato de cocaína), como en mezclas complejas (*street drugs*, drogas de la calle o de diseño) o a nivel de trazas (superficies de contacto, fluidos fisiológicos). La detección de drogas en toxicología forense puede realizarse tanto en muestras *post-mortem* (en cadáveres), como *pre-mortem*. Las muestras *post-mortem* son los especímenes recolectados durante la autopsia; entre éstos, pueden figurar -según su estado y la disponibilidad-, sangre, humor vítreo, orina, bilis, hígado y algunos otros (contenido estomacal, cabello, uñas, etc.). Las muestras *pre-mortem*, obtenidas de individuos vivos, generalmente son orina, sangre o algunos especímenes más "exóticos", menos comunes, por ejemplo, saliva, sudor, cabello, uñas y hasta lágrimas. Por supuesto, la muestra más típica es la orina, es un desecho metabólico del organismo, su obtención no es invasiva, y el peligro de contaminación microbiana para un analista es menor que cuando se trabaja con la sangre; además la orina es un líquido, con pocas interferencias presentes (proteínas, grasa) y con relativamente alta concentración de la droga o de sus metabolitos.

El método de análisis de sustancias controladas, de mayor uso a lo largo de la historia, ha sido la cromatografía, de capa fina, líquida y de gases. El método analítico, que reviste alta selectividad y sensibilidad y que permite confirmar la naturaleza química de la droga ha sido la cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría (MS). Todas las muestras toxicológicas requieren, para su subsiguiente análisis por GC-MS, una preparación previa, *i.e.*, extracción, limpieza, a menudo, derivación de analitos, para potencializar la respuesta del detector, aumentar la volatilidad y la termoestabilidad del analito o mejorar la forma de su señal cromatográfica (pico).

En general, los analitos (sustancias controladas, sus derivados o metabolitos) se podrían dividir en dos grupos grandes: (1) muestras *bulk* (en volumen), por ejemplo, la droga incautada, pastillas distribuidas al por menor (*street drug*) en la calle, productos fabricados en un laboratorio clandestino, entre otros y (2) a *nivel de trazas*; entre estos últimos figuran muestras toxicológicas (fluidos, órganos, tejidos), muestras recolectadas de las superficies de contacto con la droga, manos, empaques, tapetes, ropa, etc. Un grupo de analitos muy *sui generis* lo representan las sustancias encontradas en los laboratorios clandestinos, donde se extrae (*e.g.*, cocaína, morfina) o se sintetiza la droga de uso ilícito (*e.g.*, anfetaminas). En estos laboratorios clandestinos, los materiales de partida, los disolventes o los productos de síntesis obtenidos pueden tener rótulos o etiquetas en los recipientes muy distintos a su verdadero contenido y hay que tener mucha precaución para llevar a cabo la marcha analítica y la determinación de la naturaleza química de las sustancias.

Los análisis de sustancias controladas pueden dividirse en dos grandes grupos, según el propósito o alcance final: (1) *Pruebas presuntivas* (preliminares o de tamizaje, *screening*) y (2) *Pruebas confirmatorias*. Las pruebas presuntivas comprenden las *reacciones de color*, que se realizan *in situ* con un *kit* de reactivos específicos (por ejemplo, reactivo de Ehrlich, prueba de Marquis, reactivo de Mandelin, prueba de Scott, entre otros) que se usan, por ejemplo, en aeropuertos, puertos marítimos, aduanas, etc.; la *cromatografía de capa fina* (TLC, *Thin-Layer Chromatography*, por sus siglas en inglés), sobre todo, la TLC de alta eficiencia, que se practica en

muchos laboratorios toxicológicos, por ser un método rápido, relativamente sencillo, para establecer la presencia de una droga, *e.g.*, en casos de intoxicaciones, sobredosis, etc.; los *inmunoensayos* (por ejemplo, RIA, *Radioimmunoassay*; ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; *Enzyme-multiplied immunoassay technique*, EMIT, por mencionar algunos), que permiten seleccionar - de un gran número de muestras-, aquellas con la respuesta positiva, para seguir luego con su análisis confirmatorio. La cromatografía de gases tradicionalmente es el método más empleado para análisis de drogas de control y sus metabolitos; típicamente se usan detectores convencionales, *e.g.*, FID (detector de ionización en llama), NPD (detector de nitrógeno y fósforo) o ECD (detector de captura de electrones, para derivados), se comparan los tiempos de retención (t_R) de las sustancias (drogas) con los del material de referencia (patrones); la coincidencia de los t_R de los analitos (drogas y sustancias-patrón) resulta ser un evento necesario, pero no suficiente para la identificación confirmatoria de la sustancia. Para la confirmación positiva es menester no solamente tener el material de referencia, sino disponer de un sistema de detección espectroscópica. Entre los más usados, un detector selectivo de masas (MSD), que permite obtener y comparar los espectros de masas de la sustancia "X" y del compuesto-patrón. Las columnas cromatográficas capilares más usadas son de 5%-fenil-poli(metilsiloxano), de 25-30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno (*e.g.*, DB-5, HP-5, ultra 2, entre otras marcas comerciales). Para compuestos presentes a nivel de trazas (*e.g.*, fluidos fisiológicos), el modo de inyección al GC es *splitless* o *pulsed splitless;* para analitos termoinestables, *cold on-column*; mientras que las muestras *bulk* (en volumen), junto con otras técnicas de análisis físico-químico y espectroscópico (NMR, FT-IR, difracción de rayos X, etc.) pueden ser analizadas, inyectándolas al GC en modo *split*. Para una mejor separación de los componentes y su cuantificación, las mezclas complejas de algunas drogas de la calle (*street drugs, club drugs*), que contienen principio(s) activo(s), aditivos y adulterantes, solventes residuales, productos de descomposición o reactivos de partida, se analizan en columnas más largas (50-60 m) o empleando la cromatografía multidimensional. En la Figura 1 aparece el cromatograma típico del extracto de una pastilla decomisada (*club drug*), analizada por GC-MS (ionización electrónica, EI, 70 eV).

La clasificación de las drogas de uso ilícito se basa fundamentalmente en los efectos fisiológicos que éstas producen en el organismo y no según su estructura química. Los grupos principales de sustancias controladas en ciencias forenses comprenden: 1. *Estimulantes del sistema nervioso central* (*e.g.*, cocaína, anfetaminas); 2. *Depresores del sistema nervioso central* (entre muchos otros, alcohol, opio, opioides naturales, semi-sintéticos y sintéticos, benzodiacepinas); 3. *Alucinógenos* (LSD, mescalina, psilocibina y psilocina, algunos alcaloides tropánicos, triptaminas y sus derivados, muchos otros compuestos sintéticos, *e.g.*, fenciclidina, PCP, entre otros); 4. *Canabinoides* (productos derivados de la marihuana, material vegetal, resina, hachís, aceite de hachís); 5. *Antidepresivos* de primera, segunda y tercera generaciones y 6. *Inhalantes* (Hidrocarburos alifáticos, aromáticos, halogenados, fluorocarbonados, acetona, óxido nitroso, anestésicos gaseosos, entre otros).

La preparación de especímenes para determinar la presencia de sustancias controladas, sobre todo, cuando estos compuestos o sus metabolitos se encuentran a nivel de *trazas*, implica la realización de toda la cadena de preparación de la muestra, *i.e.*, muestreo, extracción y limpieza, derivación, análisis presuntivo y confirmatorio

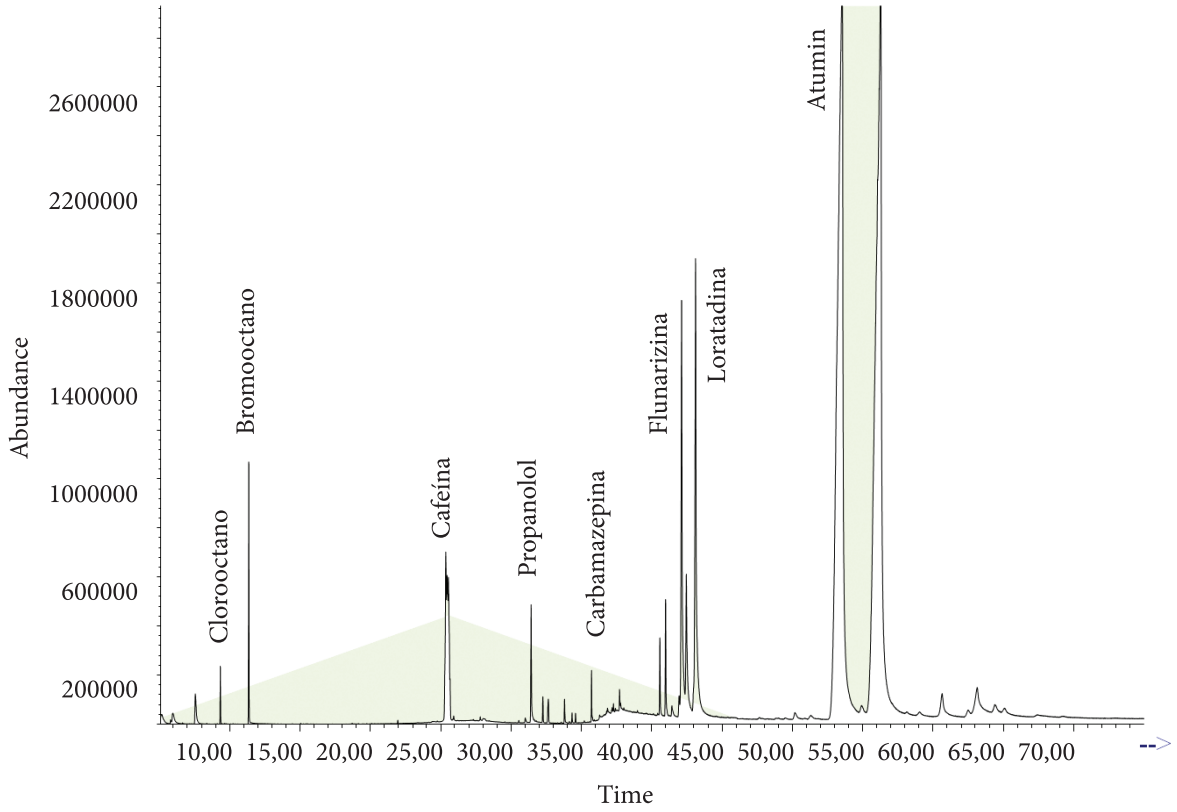


Figura 1 Perfil cromatográfico típico (TIC) del extracto de una pastilla de droga de uso ilícito (*club drug*). GC-MS. EI, 70 eV. Columna DB-5MS, 60 m.

de analitos, interpretación de datos, junto con el análisis de los respectivos blancos, negativo y positivo, y obtención de las figuras analíticas de mérito. Los métodos de extracción más usados son extracción líquido-líquido (LLE), en fase sólida (SPE), micro-extracción en fase sólida (SPME). Las operaciones-base están relacionadas también con la precipitación de proteínas, centrifugación, filtración, adición de sal (*salting out*) y el cambio de pH, según el pKa de la sustancia; la determinación de los disolventes ocultos y la perfilación (*profiling*) de drogas, que comprende la identificación de impurezas, productos de descomposición, trazas de reactivos de partida, adulterantes, artefactos, etc., se hace a menudo por métodos *headspace*, en combinación con otras técnicas de extracción, *e.g.*, SPME, con el uso de un disolvente o un adsorbente. La sensibilidad y la selectividad en el análisis se logran obteniendo fragmentogramas de masas, registrados en modo de monitoreo del ion o iones seleccionados (SIM). En la Figura 2 aparecen corrientes iónicas obtenidas en modo *full scan* (barrido completo) y SIM (iones seleccionados en *m/z* 94, 138, 303) de un extracto aislado con fluido supercrítico (SFE, CO_2) de frutos de *Datura* sp. (Familia Solanácea), que contiene la *escopolamina*, utilizada ilícitamente por los delincuentes para desorientar y paralizar la fuerza de voluntad y autocontrol de la víctima. El uso de sistemas de detección de masas tándem, por ejemplo, el de triple cuadrupolo (GC/MS-QqQ), permite elevar sobremanera la especificidad de la detección. En la Figura 3 aparecen corrientes iónicas de un extracto de una bebida (infusión) a base de diferentes plantas, que contiene trazas de cocaína, obtenidas en los modos: (**A**) *full scan*; (**B**) SIM de iones diagnóstico de la cocaína en

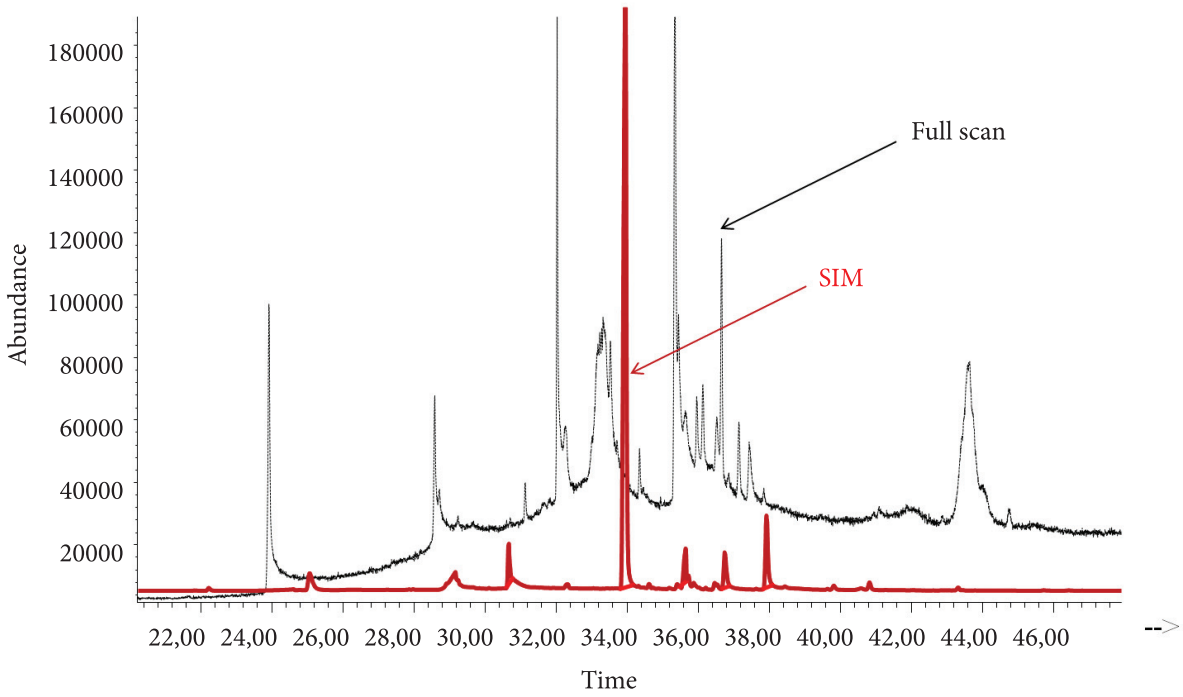


Figura 2 Corriente iónica total (TIC) de un extracto aislado con fluido supercrítico (SFE, CO_2) de frutos de *Datura* sp. (Familia Solanácea) y fragmentograma de masas del mismo extracto, obtenido con base en iones diagnóstico de la escopolamina, *i.e.*, *m/z* 94, 138 y 303.

m/z 82, 182 y 303 y (**C**) registrando la transición iónica 303→182, que permite aumentar mucho la especificidad del análisis. En las siguientes secciones se presentan ejemplos típicos del análisis GC-MS de drogas ilícitas.

2 Análisis GC-MS unidimensional

Existen varios propósitos que determinan el enfoque a seguir en el análisis cromatográfico de muestras que contengan drogas de uso ilícito. Se ha normalizado una gran cantidad de procedimientos de cuantificación de analitos particulares, tales como cocaína, opioides, anfetaminas, benzodiacepinas y drogas de diseño. En estos procedimientos normalmente se utiliza la derivación química y la determinación instrumental se realiza con el modo SIM de operación del espectrómetro de masas. El foco de atención en estos casos es la sustancia psicoactiva y su presencia se determina en matrices tan diversas como cabello, fluido oral, orina, sangre y placenta. En muchas otras situaciones el interés forense se centra en los otros componentes de la muestra, que acompañan al agente psicoactivo. Estas impurezas pueden ser residuos de la síntesis química, de la extracción o la purificación. El perfil de impurezas es la información básica para los estudios de origen y de redes de distribución.

En su revisión del tema de la derivación de sustancias psicoactivas, Lin et al.[1] mencionan 9 razones para utilizar la derivación química. Puede ser la búsqueda de formas químicas más compatibles con el ambiente cromatográfico, el favorecimiento de algún mecanismo de separación, el mejoramiento de la resolución, o de la elucidación estructural. Sin embargo, se ha identificado a la etapa de obtención de derivados como la principal fuente de prolongación y demoras en la ejecución de la marcha analítica. Una línea de desarrollo importante ha sido la búsqueda de esquemas de derivación cuantitativos, pero de duración corta y de aplicación fácil.

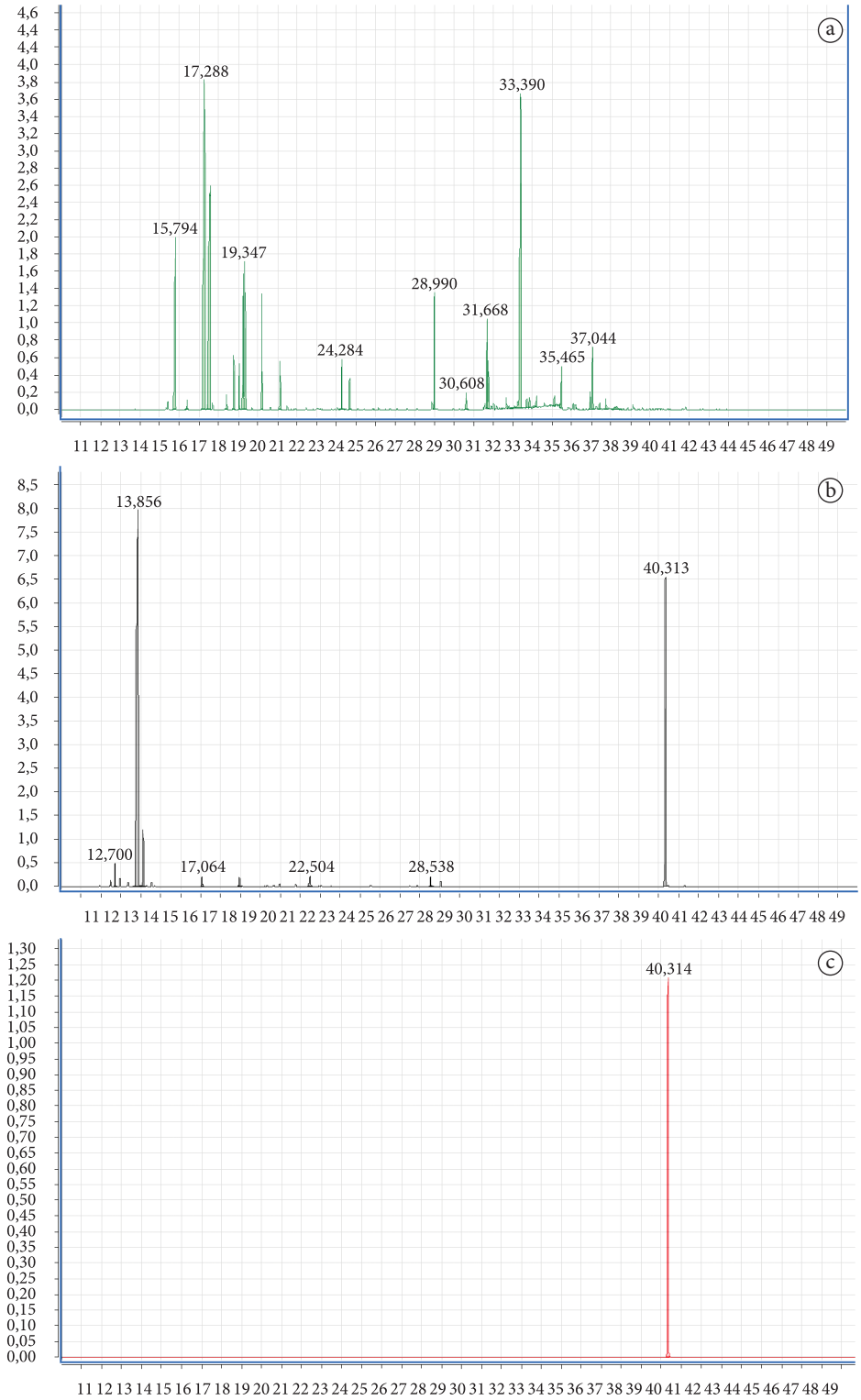


Figura 3 Extracto de una bebida (infusión) de varias plantas, que contiene trazas de cocaína. a) Corriente iónica total obtenida en modo *full scan*; b) Fragmentograma de masas (modo SIM), obtenido con base en los iones-diagnóstico de la cocaína, *i.e.*, *m/z* 82, 182, 303; y c) Registro de la transición iónica 303→182, usando la configuración tándem QqQ-MS. La máxima especificidad en la detección de la cocaína se logra usando el registro de esta transición de iones, precursor y producto, característica de la cocaína, 303→182.

Un primer ejemplo de los avances recientes es el análisis GC-MS aplicado a la determinación de anfetaminas en orina. A nivel mundial, el uso de estimulantes ha crecido bastante en la última década. Dentro de este grupo se destacan la anfetamina (AMP, "*speed*"), la metanfetamina (MET, "*ice*") y la metilendioximetanfetamina (MDMA, "éxtasis"), en los primeros lugares. Tienen amplio uso las llamadas "drogas de clubes", que además de la MDMA, incluyen a la metilendioxianfetamina (MDA, "Adán"), metilendioxietilanfetamina (MDEA, "Eva") y la N-metil-1-(3,4 metilendioxifenil)-2-butanamina (MBDB). Marais y Laurens.[2] desarrollaron un método analítico para el análisis rápido de orina en el cual se aprovecha la técnica de derivación extractiva para realizar en un solo paso la derivación de aminas con anhídrido heptafluorobutírico. La combinación de este método de derivación con el uso de la cromatografía rápida (columna DB-5 de 5 m × 100 μm, d_f 0,1 μm) permitió lograr un tiempo total de análisis de solamente 6 minutos por muestra. Gracias a la adquisición de datos en modo SIM, el método confirmatorio permitió alcanzar niveles de detección entre 1,5 y 6,2 ng mL^{-1} en la determinación simultánea de AMP, MET, metcatinona, efedrina, norefedrina, MDA, MDEA y MBDB.

Merece destacarse como el aprovechamiento efectivo de la derivación para el análisis de drogas, el método validado en el Instituto Nacional de Salud y Bienestar de Finlandia[3], para la determinación de 50 drogas de abuso diferentes, en una muestra de 1 mL de saliva. La muestra se somete a extracción con acetato de butilo y luego de centrifugación, el sobrenadante se divide en 2 porciones y la fase acuosa constituye la tercera fracción. La primera porción orgánica se deriva con MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida) para su análisis por GC-MS con ionización por impacto de electrones. Los analitos a determinar en esta fracción son todas las drogas diferentes de las benzodiacepinas y la benzoílecgonina. Para la detección y la cuantificación se utilizaron sustancias patrón y el modo de adquisición SIM, para el cual, además de grupos particulares con valores *m/z* típicos de los analitos de interés, se estudiaron las ventanas temporales apropiadas para su aplicación, con base en los tiempos de retención. La fracción 2 se pasa por una columna de extracción en fase sólida, que se eluye con una mezcla de alcohol isopropílico y acetato de etilo y se deriva con MTBSTFA [(N-metil-N-(tert-butildimetilsilil) trifluoroacetamida)]. La solución resultante se analiza por GC-MS con ionización química de iones negativos y tal como en el caso anterior, la adquisición se realiza en modo SIM, con grupos de iones y ventanas de t_R ajustadas para lograr la mejor cuantificación de benzodiacepinas patrón. Para la determinación de benzoilecgonina, la fase acuosa de la primera extracción con acetato de butilo se extrae con diclorometano. La fase orgánica se deriva con MSTFA y se analiza por GC-MS en modo SIM. Este protocolo analítico se le aplicó a 4183 muestras de saliva tomadas a choferes en Finlandia que quisieron participar voluntariamente. La sustancia controlada que apareció con mayor frecuencia en las muestras (7,2%), que tuvieron algún resultado positivo para los 50 analitos de interés, fue el citalopram (1,5% de las muestras), un medicamento antidepresivo. Una de las ventajas del método desarrollado es que utilice una muestra de fácil consecución tal como el fluido oral. Hay un interés creciente en su uso como matriz de muestra alternativa a la sangre, que es la que se usa convencionalmente. El volumen de muestra de fluido oral es menor y las concentraciones de algunas drogas pueden ser mucho menores que en la sangre. Esto demanda mayor sensibilidad y selectividad del método analítico, que debe

detectar y cuantificar varios analitos presentes en baja concentración en un volumen pequeño de muestra. Gracias a los avances instrumentales de la última década, es posible satisfacer los requerimientos que impone el análisis de fluido oral.

En comparación con la orina y la sangre, el fluido oral pertenece al grupo de especímenes denominados no-convencionales. En este conjunto se incluyen cabello, sudor, meconio, uñas y lágrimas. Presentan como ventaja sustancial que su recolección no es invasiva y puede realizarse bajo supervisión, lo cual es importante para muchas situaciones forenses y para el control de *doping* en los deportes. Existen revisiones sobre el análisis de drogas en cabello[4,5], en saliva/fluido oral[6,7] y meconio[8]. Un buen ejemplo del procedimiento utilizado en el análisis de muestras de cabello es el método desarrollado por Cordero y Peterson[9], que permite determinar en un solo cabello 18 analitos diferentes, entre opioides, anfetaminas, cocaína, diazepan y su metabolito. Una muestra de 10 a 50 mg de cabello se extrae con HCl 0,1N a 50 °C, por 16 horas. El extracto neutralizado se pasa por una columna de extracción en fase sólida, que se eluye con cloroformo--isopropanol (drogas neutras) seguido por cloroformo-isopropanol-hidróxido de amonio (drogas básicas), para luego obtener los correspondientes derivados trimetilsilílicos. El análisis GC-MS se realiza en modo SIM, empleando para cada analito 3 iones diagnóstico y ventanas de tiempo establecidas con los tiempos de retención obtenidos según el perfil cromatográfico adquirido en modo de barrido completo.

A pesar de la relativa facilidad de muestreo, los especímenes alternativos todavía no se usan comúnmente. En su revisión sobre el uso de meconio, uñas y lágrimas en el análisis de drogas, Katarzyn Madej[10] considera que una de las razones principales para el uso poco amplio de estas muestras es que los métodos analíticos requieren instrumentación costosa, de altas selectividad y sensibilidad (LC-MS, LC-MS^2). Cuando la técnica analítica es GC-MS, la determinación de sustancias controladas requiere en la mayoría de los casos la inclusión de un paso de derivación, lo cual se suma a una metodología extensa de preparación, en los casos de uñas, cabello o meconio. Aunque el análisis de meconio implica un procedimiento relativamente complicado para la eliminación de interferencias, suministra información valiosa sobre el consumo posible de drogas durante los últimos 6 meses de la gestación. Otra fuente de información complementaria es el análisis de leche materna. Fríguls et al.[11] han hecho una revisión sobre este tema, en la que presentan para diferentes tipos de drogas, tanto lícitas como ilícitas, su farmacocinética, efectos adversos sobre los niños y los procedimientos publicados sobre su determinación en leche materna. Los métodos de preparación de muestra generalmente incluyen un paso de extracción líquido-líquido o de extracción en fase sólida. Tal como ya se ha mencionado, para su determinación por GC-MS, muchas drogas requieren una derivación química que aumente su volatilidad.

Todos los tipos de muestra mencionados se emplean para establecer el posible consumo de drogas por parte de individuos. En los años recientes se han realizado estudios sobre el consumo de drogas lícitas e ilícitas por parte de poblaciones completas. Para esto, los objetos de estudio han sido las aguas residuales municipales. En el método propuesto por el Instituto de Análisis e Investigación de Alimentos de Santiago de Compostela[12], se realiza primero una extracción en fase sólida. Por reacción con MSTFA, del extracto se obtienen derivados trimetilsilílicos, que se separan por cromatografía de gases y se identifican y cuantifican en un analizador de masas de trampa iónica. Para lograr selectividad, inicialmente se realizan barridos

en el intervalo *m/z* 70-500 y luego, la trampa de iones se opera en modo resonante MS/MS para los valores de los iones padre y producto correspondientes a 18 analitos de interés y sus análogos deuterados. Dentro de los analitos de interés se incluyeron cocaína, benzoílecgonina, codeína, morfina, tetrahidrocanabinol, MDMA, MDA y MDEA. Aplicado a muestras reales, el método confirmó el ingreso de estos analitos al ambiente a través de las aguas residuales municipales.

3 La cromatografía de gases multidimensional y la perfilación

La sustancia que llega al consumidor de drogas ilícitas es una mezcla de agentes activos con muchos otros componentes que surgen de los procesos de extracción o síntesis química, de purificación y de dilución. La identificación de estos otros componentes y la determinación de sus cantidades relativas, permiten construir un perfil químico o perfil de impurezas, que distingue al producto y sirve de base para investigar los orígenes y las redes de distribución de las drogas ilícitas. Por ejemplo, la metanfetamina se puede sintetizar por los procedimientos sintéticos de Emde o de Nagai[13,14]. En el primer caso quedan residuos de cloroefedrina y en el segundo caso, las impurezas comunes son 1,3-dimetil-2--fenilnaftaleno y 1-bencil-3-metilnaftaleno. El análisis GC-MS de metanfetaminas decomisadas en Korea permitió establecer que el 80% de las muestras provino del método sintético de Emde y que en los 2 años previos aumentó en 30% el número de muestras sintetizadas por el método de Nagai[15].

En los últimos años, se han hecho esfuerzos llamados de "armonización", para establecer criterios de calidad en el análisis químico para la perfilación de drogas, que permitan la comparación de resultados de laboratorios de diferentes países e instituciones[16-18]. El reto analítico lo constituye la gran diversidad de estructuras químicas posibles dentro del conjunto de impurezas. En los métodos presentados en las secciones anteriores de este artículo hay protocolos diseñados para cuantificar drogas ilícitas individuales, mientras que otros se pueden aplicar a la determinación simultánea de mezclas multicomponente de drogas y sus metabolitos. Aunque se pueden manejar conjuntos del orden de 50 analitos diferentes, se dispone de sustancias patrón para cada uno y con éstos se calibra y optimiza el desempeño del método analítico. En todos estos casos se utiliza la cromatografía unidimensional y la detección y cuantificación de alta selectividad se buscan con la adquisición de corrientes iónicas en modo SIM. Para el propósito de obtener el perfil químico, el gran número de analitos requiere que se aumente la resolución cromatográfica. Por esto, si bien los métodos de análisis GC-MS de drogas ilícitas se usan de manera rutinaria en tareas de cuantificación para analitos específicos, las técnicas multidimensionales han encontrado gran aplicación en el campo de la perfilación de drogas y se han extendido a otros estudios forenses relacionados.

Kolbrich et al.[19] utilizaron una técnica 2D-GC/MS para el análisis de plasma humano, en la que una válvula de conmutación de tecnología microfluídica (*Deans switch*) traslada secciones del flujo de una columna cromatográfica a otra de diferente fase estacionaria, a través de una trampa criogénica de calentamiento programable. El uso de adquisición en modo SIM permitió lograr límites de cuantificación entre 1,0 y 2,5 μg L^{-1} para MDA, MDEA, MDMA, 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA) y 4-hidroxi-3-metoxianfetamina (HMA). Análogos perdeuterados de estas sustancias sirvieron como patrones internos. El uso de la cromatografía bidimensional permi-

tió el desarrollo de este método para el análisis simultáneo de 5 aminas relacionadas estructuralmente, cuyos tiempos de retención son cercanos.

Se han desarrollado métodos basados en 2D-GC/MS para diversas drogas ilícitas. Un ejemplo de los avances logrados lo constituye el análisis de marihuana, el cual demanda alta resolución porque aunque el tetrahidrocanabinol es la principal sustancia activa, puede estar junto con más de 60 canabinoides diferentes, que se han detectado en *Cannabis sativa*. Se han reportado métodos 2D-GC/MS para determinar estos analitos en sangre[20], plasma humano[21,22], fluido oral[23,24], cabello[25] y meconio[26]. Estos son métodos exitosos, que logran una buena separación con alta sensibilidad. Sin embargo, mezclas más complejas requieren un número alto de cortes (*heart-cuttings*) que se redirigen hacia la segunda columna y no siempre se logra trasladar todos los analitos de interés. Para atender estas situaciones y en general todos aquellos casos en donde se tienen mezclas complejas con constituyentes de naturaleza desconocida, se recurre al siguiente nivel de desarrollo, que es la cromatografía completa, GC × GC. En esta técnica, todo el efluente de la primera columna se traslada a la segunda columna por medio de un sistema periódico de conmutación con crioenfocamiento[27]. De esta forma, todos los compuestos coeluidos en la primera columna pueden, en principio, separarse en la segunda columna, que tiene una fase estacionaria con polaridad opuesta (ortogonal) a la de la primera columna. En comparación con la cromatografía unidimensional, GC × GC tiene una capacidad mucho mayor de resolución de componentes y proporciona una relación S/N más alta. A estas ventajas se suma otra de utilidad especial en el caso de la perfilación de drogas, como es la formación de grupos de sustancias de naturaleza química similar, en el mapa bidimensional que se obtiene como respuesta de la técnica GC × GC. Esto facilita la comparación de muestras y permite establecer criterios de similitud. En un estudio de 24 tabletas de éxtasis, la comparación de los perfiles bidimensionales mostró la existencia de 8 grupos, según su contenido de impurezas. El análisis de componentes principales aplicado al conjunto de datos reveló claramente la formación de grupos según el país de origen[28].

En su revisión de la aplicación de la cromatografía completa al análisis de drogas ilícitas, Mitrevski, Wynne y Marriott.[29] destacaron que el espectrómetro de masas que mejor satisface la velocidad de barrido que requiere la técnica GC × GC es el de analizador de tiempo de vuelo (TOF). El principal obstáculo a vencer para aumentar la aplicación de la cromatografía completa es el manejo de los datos. Se requieren herramientas que faciliten el manejo del gran volumen de información que genera la técnica, para que el usuario pueda realizar de manera sencilla tareas como deconvolución, búsqueda de agrupaciones según diversos criterios y la aplicación de técnicas de la estadística multivariable.

Aunque en GC × GC los mejores resultados se obtienen con un analizador de tiempo de vuelo, ya existen algunas aplicaciones en las que se usa un analizador cuadrupolar. Song et al.[30] reportaron la detección de 77 componentes en una mezcla de drogas por medio de GC × GC con analizador cuadrupolar, cuyo rango de masas no cubría todo el espectro de masas sino un intervalo pequeño, que podría corresponder a los extremos inferior o superior del espectro para, de esta forma, lograr tiempos de barrido cortos, compatibles con las necesidades de la técnica de cromatografía rápida (segunda columna).

El carácter no específico, de amplio espectro, del análisis GC × GC, se ilustra en el trabajo publicado por Guthery et al.[31], sobre análisis de drogas en muestras de cabello por técnicas

LC-MS y GC × GC-TOF/MS. Mientras que los métodos LC-MS permitieron la cuantificación de codeína, morfina, anfetamina, metanfetamina, metadona, bencilpiperazina y MDMA, el análisis GC × GC-TOF/MS logró detectar la presencia no prevista de cocaína, diazepan y metacualona. La identificación se logró por comparación de los espectros de masas con los de bases de datos. Tal como en las metodologías GC-MS unidimensionales, la preparación de la muestra incluye una etapa de derivación, generalmente, hacia los derivados trimetilsilílicos (con MSTFA), para mejorar las propiedades cromatográficas de los analitos que posean grupos funcionales con hidrógenos lábiles. Aunque los métodos para analitos específicos suministran sensibilidades altas, su uso en tareas de tamizaje para un número grande de compuestos está obstaculizado por los altos costos y el mayor tiempo que implica realizar varios análisis por muestra. Para estos casos, GC × GC TOF/MS tiene la gran ventaja de que se realiza un solo análisis por muestra, con alta sensibilidad. Además, la información espectral permite la identificación de sustancias o contaminantes desconocidos, lo cual no se logra con los métodos para analitos específicos.

Además de la resolución cromatográfica, en las técnicas acopladas GC-MS la espectrometría de masas aporta la posibilidad de alcanzar altas sensibilidades y selectividades. En el caso de la espectrometría de masas de alta resolución, la gran capacidad de discriminación que se obtiene en la detección de masas exactas permite lograr en acoplamiento con la cromatografía unidimensional, resultados equivalentes o superiores a los que se obtienen con GC × GC-TOF/MS cuando en esta última técnica la resolución másica es unitaria. Un ejemplo del uso de la espectrometría de masas de alta resolución para la obtención de alta sensibilidad es el método desarrollado por Georgakopoulos et al.[32] para la determinación de esteroides en orina, que utiliza tanto LC-TOF/MS como GC-TOF/MS. Luego de la extracción líquido-líquido de la muestra de orina hidrolizada, se obtienen los derivados trimetilsilílicos para su análisis GC-TOF/MS y una alícuota sin derivar se analiza por LC-TOF/MS. El método permitió alcanzar niveles de detección de entre 10 y 500 ng mL^{-1} para agentes anabólicos, corticosteroides, estimulantes, bloqueadores β, diuréticos y narcóticos. El uso de la ionización por impacto de electrones en sistemas GC-MS de alta resolución presenta el inconveniente de que junto con la producción de una alta fragmentación molecular, genera dificultades para la identificación por comparación espectral con bases de datos, ya que todavía están en desarrollo las bases de datos espectrales de alta resolución. El uso de métodos de ionización suave en combinación con la alta resolución podría ser una buena alternativa. Sin embargo, se pueden obtener cromatogramas con menor ruido químico si se extraen de la corriente iónica total los valores de masas dentro de ventanas o intervalos de tiempo angostos. Bajo estas condiciones se mejora considerablemente la comparación con espectros obtenidos en analizadores convencionales[33].

4 Conclusiones

La técnica GC-MS se utiliza exitosamente en el análisis de drogas de uso ilícito, tanto en la determinación de sustancias específicas como en la obtención de los perfiles de composición química, en aplicaciones desarrolladas para satisfacer diversos propósitos clínicos, toxicológicos o forenses. La gran diversidad de estructuras químicas tanto de las sustancias activas como de sus contaminantes, así como de las matrices en las que se realiza el examen, hacen que la preparación de la muestra juegue un papel determinante.

Los avances tanto en la separación cromatográfica (GC × GC) como en la detección espectrométrica (SIM, MS/MS, alta resolución) permiten alcanzar sensibilidades (1 en 10^9) y especificidades altas en el análisis de mezclas complejas que contienen drogas de uso ilícito.

Referencias

1 Dong-Liang L, Sheng-Meng W, Chih-Hung W, Bud-Gen C, Ray L. Chemical derivatization for the analysis of drugs by GC-MS - A conceptual review. *Journal of Food and Drug Analysis* 2008; 16(1):1-10.

2 Marais A, Laurens J. Rapid GC-MS confirmation of amphetamines in urine by extractive acylation. *Forensic Science International* 2009; 183:78-86. http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.10.021

3 Langel K, Gunnar T, Ariniemi K, Rajamäki, O, Lillsunde P. A validated method for the detection and quantitation of 50 drugs of abuse and medicinal drugs in oral fluid by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2011; 879:859-870. http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.02.027

4 Sachs H, Kintz P. Testing for drugs in hair: Critical review of chromatographic procedures since 1992. *Journal of Chromatography B* 1998; 713:147-161. http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00168-6

5 Pragst F, Balikova M. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica Chimica Acta* 62006; 370:17-49. http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2006.02.019

6 Drummer O. Introduction and review of collection techniques and applications of drug testing of oral fluid. *Therapeutic Drug Monitoring* 2008; 30:203-206.

7 Schramm W, Smith R, Craig P, Kidwell D. Drugs of abuse in saliva: A review. *Journal of Analytical Toxicology* 1992; 16:1-9.

8 Moore C, Negrusz A, Lewis D. Determination of drugs of abuse in meconium. *Journal of Chromatography B* 1998; 713:137-146. http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00479-9

9 Cordero R, Paterson S. Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC-MS. *Journal of Chromatography B* 2007; 850:423-431. http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.12.021

10 Madej K. Analysis of meconium, nails and tears for determination of medicines and drugs of abuse. *Trends in Analytical Chemistry* 2010; 29(3):246-259. http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2010.01.005

11 Fríguls B, Joya X, García-Algar O, Pallás C, Vall O, Pichini S. A comprehensive review of assay methods to determine drugs in breast milk and the safety of breastfeeding when taking drugs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010; 397:1157-1179. http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-3681-0

12 González-Mariño I, Quintana J, Rodríguez I, Cela R. Determination of drugs of abuse in water by solid-phase extraction, derivatisation and gas chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2010; 1217:1748-1760. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.046

13 Kishi T, Inoue T, Suzuke S, Yasuda T, Okikawa T, Niwaguchi T. Analysis of impurities in methamphetamine. *Eisei Kagaku* 1983; 29:39- 48. http://dx.doi.org/10.1248/jhs1956.29.6_400

14 Emde H. Über diastereomerie I. Konfiguration des ephedrines. *Helvetica Chimica Acta* 1929; 12:365-376. http://dx.doi.org/10.1002/hlca.19290120142

15 Ko B, Suh S, Suh Y, In M, Kim S. The impurity characteristics of methamphetamine synthesized by Emde and Nagai method. *Forensic Science International* 2007;170:142-147. http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.03.029

16 Strömberg L, Lundberg L, Neumann H, Bobon B, Huizer H, Van Der Stelt N. Heroin impurity profiling. A harmonization study for retrospective comparisons. *Forensic Science International* 2000; 114:67-88. http://dx.doi.org/10.1016/S0379-0738(00)00295-4

17 Lociciro S, Hayoz P, Esseiva P, Dujourdy L, Besacier F, Margot P. Cocaine profiling for strategic intelligence purposes, a cross-border project between France and Switzerland. Part I. Optimisation and harmonisation of the profiling method. *Forensic Science International* 2007; 167:220-228. http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.06.052

18 Weyermann C, Marquis R, Delaporte C, Esseiva P, Lock E, Aalberg L et al. Drug intelligence based on MDMA tablets data I. Organic impurities profiling. *Forensic Science International* 2008; 177:11-16. http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.10.001

19 Kolbrich E, Lowe R, Huestis M. Two-dimensional gas chromatography/electron-impact mass spectrometry with cryofocusing for simultaneous quantification of

MDMA, MDA, HMMA, HMA, and MDEA in human plasma. *Clinical Chemistry* 2008; 54(2):379-387. http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2007.096800

20 Scurlock R, Ohlson G, Worthen D. The detection of Δ^9-tetrahydrocannabinol (THC) and 11-nor-9-carboxy-Δ^9-tetrahydrocannabinol (THCA) in whole blood using two-dimensional gas chromatography and EI-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* 2006; 30:262-266.

21 Lowe R, Karschner E, Schwilke E, Barnes A, Huestis M. Simultaneous quantification of Δ^9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-Δ^9-tetrahydrocannabinol, and 11-nor-Δ^9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human plasma using two-dimensional gas chromatography, cryofocusing, and electron impact-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2007; 1163:318-327. http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-3599-6

22 Karschner E, Barnes A, Lowe R, Scheidweiler K, Huestis M. Validation of a two-dimensional gas chromatography mass spectrometry method for the simultaneous quantification of cannabidiol, Δ9-tetrahydrocannabinol (THC),11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC in plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010; 397:603-611. http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-3599-6

23 Moore C, Coulter C, Rana S, Vincent M, Soares J. Analytical procedure for the determination of the marijuana metabolite 11-nor-Δ^9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in oral fluid specimens. *Journal of Analytical Toxicology* 2006; 30:409-412.

24 Moore C, Rana S, Coulter C, Day D, Vincent M, Soares J. Detection of conjugated 11-nor-Δ^9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in oral fluid. *Journal of Analytical Toxicology* 2007; 31:187-194.

25 Moore C, Rana S, Coulter C, Feyerherm F, Prest H. Application of two-dimensional gas chromatography with electron capture chemical ionization mass spectrometry to the detection of 11-nor-Δ^9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH) in hair. *Journal of Analytical Toxicology* 2006; 30:171-177.

26 Marin S, Coles R, Urry F, McMillin G. Confirmation of cannabinoids in meconium using two-dimensional gas chromatography with mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography B* 2007; 858:59-64. http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.08.026

27 Harynuk J, Marriott P. GS-MS principles and instrumentation: comprehensive two-dimensional gas chromotography mass spectrometry. In: Caprioli R, editor. *The Encyclopedia of Mass Spectrometry.* Oxford: Elsevier; 2006. vol. 8: Hyphenated Methods, cap. 2, p. 83-92.

28 Mitrevski B, Veleska B, Engel E, Wynne P, Song S, Marriott P. Chemical signature of ecstasy volatiles by comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Forensic Science International* 2011; 209:11-20. http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.11.008

29 Mitrevski B, Wynne P, Marriott P. Comprehensive two-dimensional gas chromatography applied to illicit drug analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2011; 401:2361-2371. http://dx.doi.org/10.1007/s00216-011-5234-6

30 Song S, Marriott P, Wynne P. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry (GC × GC-TOFMS) for drug screening and confirmation. *Journal of Chromatography A* 2004; 1058:223-232. http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(04)01444-X

31 Guthery B, Bassindale T, Bassindale A, Pillinger C, Morgan G. Qualitative drug analysis of hair extracts by comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2010; 1217:4402-4410. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.020

32 Georgakopoulos C, Vonaparti A, Stamou M, Kiousi P, Lyris E, Angelis Y et al. Preventive doping control analysis: liquid and gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for detection of designer steroids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007; 21:2439-2446. http://dx.doi.org/10.1002/rcm.3103

33 Pavlic M, Libiseller K, Oberacher H. Combined use of ESI-QqTOF-MS and ESI-QqTOF-MS/MSwith mass-spectral library search for qualitative analysis of drugs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2006; 386:69-82. http://dx.doi.org/10.1007/s00216-006-0634-8

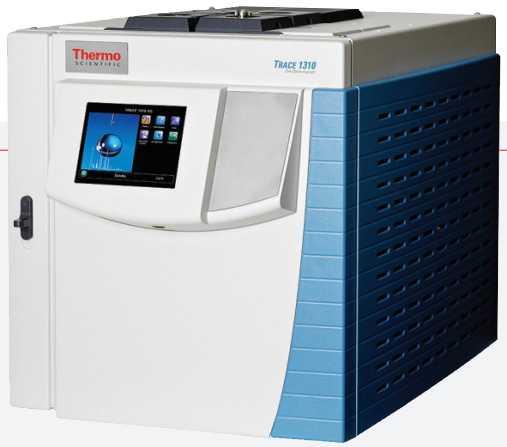
Recebido: 14/03/2012
Aceito: 22/03/2012

Novo Cromatógrafo a gás modular

O novo TRACE 1300 Series GC da Thermo Scientific é o primeiro e único cromatógrafo a gás com injetores e detectores que podem ser trocados pelo usuário através de conexões instantâneas. Esta característica exclusiva torna o TRACE 1300 um sistema capaz de satisfazer todas as necessidades do laboratório de forma simples e eficiente. Seu projeto modular facilita o acesso aos injetores e detectores, elimina a necessidade de interrupção das atividades para manutenção e permite ao usuário configurar rapidamente o instrumento conforme suas aplicações específicas e rotina diária. Conheça o desempenho e a produtividade incomparáveis do sistema TRACE 1300 Series GC

redefinindo a usabilidade do GC

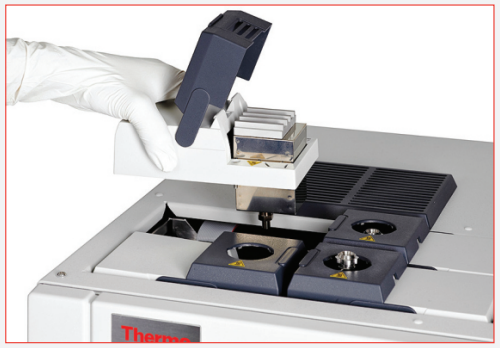
- veja a melhor escolha para cromatografia a gás em: www.thermoscientific.com/trace1300



Trace GC 1300 Series

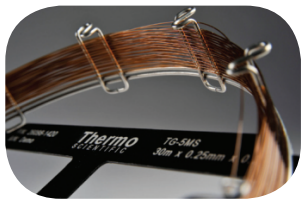
Eficiência incomparável para aplicações de rotina

- Injetores e detectores modulares, de conexão instantânea
- Fácil implementação de métodos
- Injetor com robustez inigualável
- Detector com sensibilidade excepcional
- Instrumento controlado por Chromeleon™ CDS



Exemplo de instalação de um módulo de conexão instantânea pelo usuário

Com ferramentas extremamente funcionais e de fácil operação, o Chromeleon 7 é simplesmente inteligente



As colunas e os demais consumíveis da Thermo Scientific garantem qualidade e a produtividade do seu novo GC

analítica
analiticaweb.com.br

Thermo
SCIENTIFIC

Scientia Chromatographica 2012; 4(1):35-51
Instituto Internacional de Cromatografia
http://dx.doi.org/10.4322/sc.2012.004
ISSN 1984-4433

Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações

Manoel Leonardo Martins[1], Ednei Gilberto Primel[2], Sergiane Souza Caldas[2], Osmar Damian Prestes[3], Martha Bohrer Adaime[1], Renato Zanella[1*]

[1]*Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Cep 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil*
e-mail: rzanella@base.ufsm.br
[2]*Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Cep 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil*
[3]*Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, Campus Itaqui, Cep 97650-000, Itaqui, RS, Brasil*

Resumo

Nos últimos anos, as técnicas clássicas de preparo de amostra para a determinação de compostos orgânicos em amostras ambientais e alimentos estão sendo substituídas por técnicas miniaturizadas que são caracterizadas pelo baixo custo, alta eficiência, reduzida quantidade de solvente, além da possibilidade de automação. Dentre essas técnicas, a Microextraçao Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) apresenta-se como uma interessante alternativa para o preparo de amostra e está baseada na partição dos analitos de interesse empregando-se pequenos volumes de uma mistura de solventes (dispersor e extrator). A DLLME apresenta como principais vantagens a miniaturização, baixo custo, rapidez, alta eficiência de extração e pré-concentração, bem como potencial para aplicação direta em campo. Esta revisão apresenta fundamentos e aplicações da DLLME na determinação de compostos orgânicos em diferentes tipos de amostras.

Palavras-chave

Preparo de amostra; extração miniaturizada; compostos orgânicos; cromatografia.

Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME): fundamentals and applications

Abstract

In the last years, the classical sample preparation techniques for the determination of organic compounds in environmental and food samples are being replaced by miniaturized techniques that are characterized by low cost, high efficiency, low solvents consume, with the possibility of automation. Among these techniques, the Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME) presents an interesting alternative for sample preparation and is based in the partition of analytes using a mixture of solvents (disperser and extractor). The DLLME presents as main advantages the miniaturization, low cost, the speed, the efficiency of extraction and preconcentration, as well as the potential for direct application in the field. This review presents the fundamentals and recent applications of DLLME in the analysis of organic compounds in different samples.

Keywords

Sample preparation; miniaturized extraction; organic compounds; chromatography.

1 Introdução

O preparo de amostra é uma das etapas críticas do processo analítico e tem sido um dos principais obstáculos para a obtenção de resultados adequados em termos de precisão e detectabilidade. Para minimizar estes problemas, diferentes métodos têm sido propostos a fim de otimizar e propor alternativas à extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) convencional. A LLE é um método clássico de extração e pré-concentração de analitos, ainda muito utilizado. No entanto, caracteriza-se pela demora, requer grandes volumes de solventes orgânicos, além de envolver várias etapas que estão associadas com as perdas de analito e ocorrência de contaminação[1]. Atualmente, atenção especial é dispensada para métodos que sejam rápidos, eficientes e ambientalmente corretos. Desta forma, métodos baseados em microextração vêm sendo desenvolvidos como alternativas aos métodos clássicos de extração.

A Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), proposta em 2006 por REZAEE e colaboradores[2], utiliza um solvente dispersor, miscível no solvente extrator (fase orgânica) e na amostra (fase aquosa), bem como um solvente extrator, imiscível na fase aquosa, sendo baseada em um sistema ternário de solventes como a Extração Líquido-Líquido Homogênea (HLLE, do inglês *Homogeneus Liquid-Liquid Extraction)* e a Extração em Ponto de Nuvem (CPE, do inglês *Cloud Point Extraction)*[3]. A DLLME é uma técnica de extração e pré-concentração de amostras que atende aos requisitos de miniaturização, baixo custo, rapidez e eficiência de extração e com alto potencial para aplicação direta em campo[4].

Na DLLME, o tempo de extração é definido como o intervalo entre a injeção da mistura de solventes e a centrifugação. A área superficial entre o solvente de extração e a fase aquosa é infinitamente grande. Assim, a transferência dos analitos da fase aquosa para a fase extratora é rápida e, portanto, o estado de equilíbrio é atingido rapidamente[3].

A mistura de solventes é introduzida na amostra em um tubo de fundo cônico, conforme Figura 1, onde ocorre a extração dos analitos por partição e, após, a mistura é centrifugada. O solvente extrator sedimentado no fundo do tubo é recolhido e analisado. O processo de extração ocorre de forma muito parecida com aquele da Extração Líquido-Líquido tradicional.

Na LLE, a mistura do solvente orgânico com a amostra aquosa é promovida por agitação, e a formação de bolhas ou gotas de solvente orgânico garante o aumento da superfície de troca para favorecer a partição dos analitos entre as fases[3].

Na DLLME, a mistura obtida pela injeção rápida de um jato de uma mistura de solventes, onde um solvente miscível na fase aquosa (solvente dispersor) e na fase orgânica (solvente extrator) promove a dispersão desta última na forma de microgotas com grande área superficial onde ocorre a partição, como está representado na Figura 1.

Outra diferença entre a técnica LLE e a DLLME é que na LLE geralmente são realizadas etapas sucessivas de extração, para aumento da eficiência, enquanto que na DLLME a extração ocorre em uma única etapa. Se a eficiência de extração for próxima a 100%, a técnica DLLME pode ser considerada um técnica exaustiva, caso contrário é considerada uma técnica de equilíbrio[6].

2 Princípios da DLLME

A técnica DLLME é normalmente realizada em duas etapas conforme representado na Figura 2. A primeira etapa consiste na injeção de uma mistura adequada dos solventes extrator e

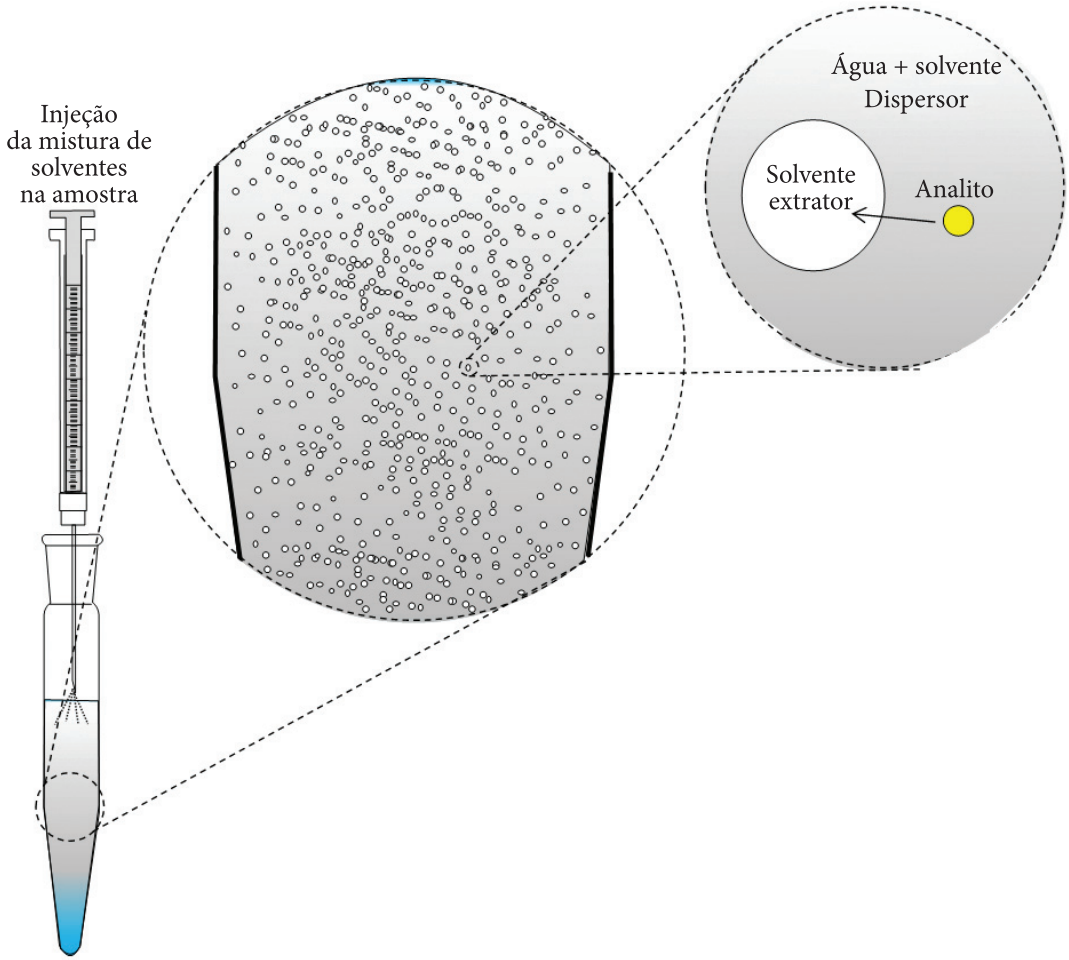


Figura 1 Diagrama simplificado demonstrando a injeção da mistura dos solventes na amostra, a dispersão do solvente extrator na amostra e a partição do analito entre a amostra e o solvente extrator.

dispersor na amostra aquosa contendo os analitos. Nesta etapa, o solvente extrator é disperso na fase aquosa em gotas muito finas extraindo os analitos. Esta dispersão do solvente extrator é favorecida pelo solvente dispersor, que deve ser solúvel na amostra aquosa e na fase orgânica. Devido à grande área superficial entre o solvente extrator e a amostra aquosa, o equilíbrio é atingido rapidamente e a extração é independente do tempo, sendo esta a principal vantagem deste método[3]. A segunda etapa é a centrifugação da solução turva e a transferência da fase sedimentada para um frasco (microvial) que permitirá a determinação dos analitos.

A DLLME baseia-se no processo de partição dos analitos entre duas fases líquidas imiscíveis, sendo uma delas a fase aquosa (a amostra) e a outra um fase orgânica (solvente orgânico) A solubilização dos analitos em qualquer uma das fases é governada pela polaridade relativa do sistema, sendo que os analitos são geralmente apolares, apresentando maior afinidade pela fase orgânica, composta por um solvente orgânico apolar, em comparação com a fase aquosa, que é, por sua vez, altamente polar[7].

A polaridade de uma molécula refere-se às concentrações de cargas da nuvem eletrônica em volta da molécula. Moléculas polares possuem

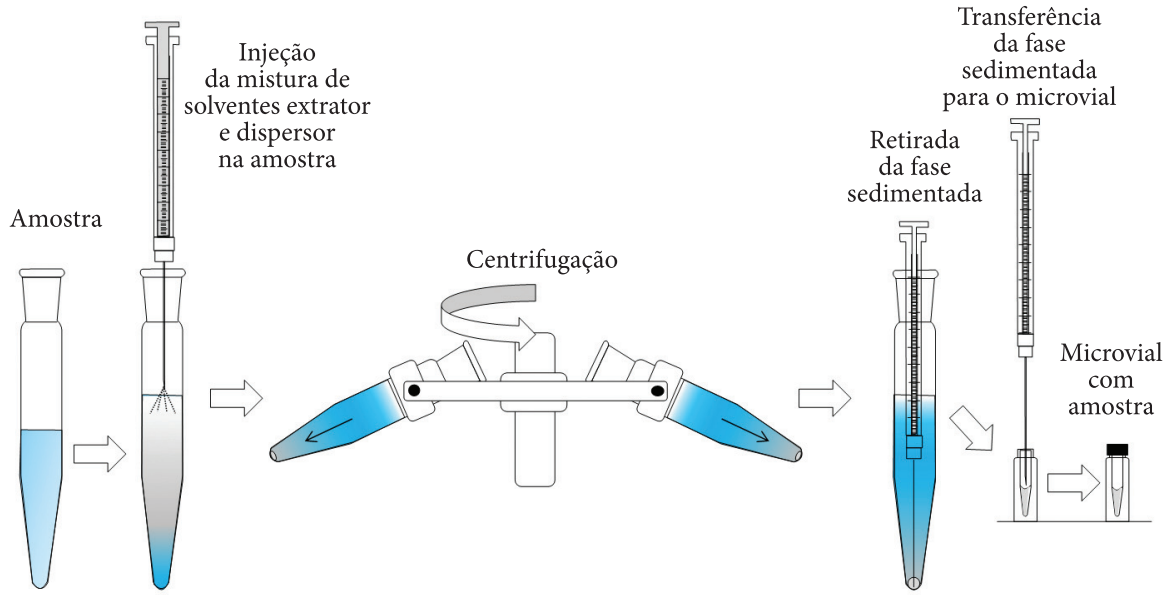


Figura 2 Diagrama simplificado demonstrando as etapas da DLLME, adaptado de Berijani et al.[5]

maior concentração de carga negativa numa parte da nuvem e maior concentração positiva em outro extremo. Nas moléculas apolares, a carga eletrônica está uniformemente distribuída. As diferenças de cargas elétricas entre as moléculas dos analitos, da fase aquosa (polar) e da fase orgânica (apolar), é que determinam o equilíbrio resultante[7], que pode ser representado por:

$$A_{aq} \rightleftharpoons A_{org} \quad (1)$$

No caso ideal, a razão das atividades do analito A nas duas fases é uma constante e independe da quantidade de A, sendo que para uma dada temperatura, a constante de equilíbrio (K_D) é o coeficiente de partição ou distribuição[7], sendo representado como:

$$K_D = \frac{[A_{org}]}{[A_{aq}]} \quad (2)$$

onde: A: Analito; aq: fase aquosa; org: fase orgânica; K_D: coeficiente de distribuição ou partição; [ ]: atividade ou concentração relativa do analito.

Depois do tempo necessário para que seja atingido o equilíbrio da partição do analito, as fases são separadas. Alguns fatores afetam a polaridade relativa do sistema, tais como presença ou adição de sais, alterações no pH da fase aquosa, modificadores químicos ou misturas de solventes solúveis ou parcialmente solúveis na fase aquosa[2].

A fase orgânica ou extrato poderá conter a maior proporção do analito. Se esta quantidade for próxima a 100% pode ser considerada uma técnica de extração exaustiva e a exatidão do método, expressa em termos de recuperação, pode ser calculada através da seguinte Equação 3:

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C3} \times 100 \quad (3)$$

onde: C_1 = concentração do analito determinada na amostra fortificada; C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada; C_3 = concentração do analito adicionada na amostra fortificada.

Se a transferência do analito entre a fase aquosa e a fase orgânica for parcial, a extração por DLLME será considerada uma técnica de equilíbrio[6]. Neste caso, a recuperação (R) pode ser definida como a quantidade total de analito,

em porcentagem, que é transferida para a fase aceptora (ou orgânica) ao final da extração. A razão entre o volume da fase doadora (aquosa) e a fase aceptora (orgânica) também governa a recuperação do analito, de acordo com a Equação 4[8].

$$R(\%) = \frac{K_D V_{org}}{K_D V_{org} + V_d} \times 100 \quad (4)$$

onde: K_D: coeficiente de distribuição ou partição; V_{org} = volume da fase orgânica; V_d = volume da fase doadora (ou aquosa).

Portanto a extração em duas fases é favorecida para analitos hidrofóbicos, ou seja, com elevados coeficientes de partição (entre 500 e 1000 ou maiores)[8]. Adicionalmente, a recuperação pode ser favorecida aumentando-se a razão entre as fases aceptora (orgânica) e doadora[6].

Outro parâmetro comumente utilizado para demonstrar a eficiência dos processos de microextração em fase líquida, como no caso da DLLME, é o fator de enriquecimento (E), que informa o grau de concentração do analito obtido na extração e pode ser calculado pela Equação 5:

$$E = \frac{V_d R}{100 V_{org}} \quad (5)$$

como os valores de V_d/V_{org} são normalmente elevados, altos fatores de enriquecimento são obtidos[6,9].

3 Parâmetros relacionados à eficiência de extração por DLLME

Os principais fatores que afetam a eficiência da extração por DLLME, são: tipo e volume dos solventes extrator e dispersor. Em DLLME, os fatores mais importantes que afetam o volume da fase sedimentada são: solubilidade do solvente extrator em água, volume e características da amostra, volume do solvente dispersor e volume do solvente extrator. Do ponto de vista experimental, para obter um volume adequado de fase sedimentada, alguns testes devem ser efetuados antes do início da otimização[10,11].

3.1 Seleção do solvente extrator

O principal parâmetro a ser definido para a otimização de um procedimento de extração por DLLME é o tipo de solvente extrator, que deve ser escolhido com base na sua densidade, capacidade de extração dos analitos de interesse e adequação à técnica analítica escolhida[12].

Na Tabela 1, estão listadas as propriedades de solventes de uso comum em laboratórios de análises que podem ser utilizados na técnica DLLME como solvente extrator ou como solvente dispersor e algumas de suas propriedades físico-químicas.

O solvente extrator deve ter densidade maior que a água, de forma a permitir a formação da fase sedimentada[14], embora aplicações descrevam a utilização de solventes extratores com densidade menor que a da água[15,16]. Tanto o solvente extrator quanto o solvente dispersor devem ter pressão de vapor relativamente baixa e temperatura de ebulição relativamente alta, para evitar perdas significativas de solvente durante o processo de extração[17]. Outra característica importante do solvente extrator é ter baixa solubilidade em água, permitindo a separação adequada do extrato orgânico[18].

Quando utilizada a determinação por Espectrometria de Massas, as massas moleculares dos solventes utilizados devem ser consideradas para evitar interferências espectrais. O ponto de fusão do solvente extrator pode ser importante, no caso de aplicação de resfriamento para congelamento da fase sedimentada (gota) para posterior separação da fase aquosa[15]. Se for utilizada a Cromatografia Gasosa para separação dos analitos, o ponto de ebulição do solvente extrator será determinante na transferência do analito para a coluna cromatográfica e separação[3].

Tabela 1 Algumas propriedades físico-químicas de alguns solventes passíveis de serem utilizados como solventes extratores e dispersores.

Solvente	Massa molar ($g.mol^{-1}$)	Solubilidade em água ($g.L^{-1}$, 20 °C)	Ponto de fusão (°C)	Densidade ($g.cm^{-3}$, 20 °C)	Ponto de ebulição (°C, 1013 hPa)	Pressão de vapor (mmHg, 20 °C)
Extratores						
Tetracloreto de Carbono	153,8	0,8	–23	1,59	76,7	90
Clorofórmio	119,4	8	–63	1,47	61	158
Diclorometano	84,9	20	–95	1,33	40	356
1,2-Dicloroetano	99,0	8,7	–35,5	1,25	83,5-84,1	65
Acetato de etila	88,1	85,3	–83	0,90	77	73
1-Clorobutano	92,6	0,5	–123	0,886	79	83
Benzeno	78,1	1,8	5,5	0,88	80,1	76
Tolueno	92,1	0,52	–95	0,87	110,6	22
1-Butanol	74,1	77	–89	0,81	116-118	5
Éter tert-butil-metílico	88,2	42	–108,6	0,74	55,3	201
Ciclo-hexano	84,2	0,055	6	0,78	81	77
Iso-octano	114,2	0,00056	–107	0,69	99	38
n-Heptano	100,2	0,05	–90,5	0,68	97-98	36
n-Hexano	86,2	0,0095	–94,3	0,66	69	120
Dispersores						
Tetra-hidrofurano	72,1	solúvel	–108,5	0,89	65-66	-
1,4-Dioxano	88,1	solúvel	12	1,03	101,5	31
1-Propanol	60,1	solúvel	–127	0,80	96,5-98	14
Metanol	32,0	solúvel	–98	0,792	64,5	96
Etanol	46,1	solúvel	–114,5	0,79	78,3	44
Acetona	58,1	solúvel	–95,4	0,79	56,2	175
Acetonitrila	41,5	solúvel	–45,7	0,786	81,6	73
2-Propanol	60,1	solúvel	–89,5	0,786	82,4	32

Fonte: Merck (2010) (http://www.merck-chemicals.com.br/solventes-para-cromatografia-analitica-lichrosolv-)[13].

3.2 Seleção do solvente dispersor

O parâmetro fundamental para a escolha do tipo de solvente dispersor é sua solubilidade tanto na fase orgânica quanto na fase aquosa. O volume de solvente dispersor afeta diretamente a formação das microgotas de água/solvente dispersor/solvente extrator, o grau de dispersão do solvente na fase aquosa e, consequentemente, a eficiência da extração[14].

3.3 Efeito do volume dos solventes extrator e dispersor

O volume do solvente extrator determina o fator de pré-concentração da DLLME. Aumentando o volume do solvente extrator, o volume da fase sedimentada obtido com a centrifugação aumenta, resultando em um menor fator de pré-concentração. Portanto, o volume

ótimo de solvente extrator deve garantir tanto um alto fator de pré-concentração quanto permitir a obtenção de um volume de fase sedimentada suficiente para as análises necessárias[19].

Variações no volume do solvente dispersor causam variações no volume da fase sedimentada, tornando necessário modificar simultaneamente o volume do solvente extrator e o volume do solvente dispersor para manter constante o volume da fase sedimentada. O volume adequado de solvente dispersor para uma boa formação das microgotas depende tanto do volume da fase aquosa quanto do volume do solvente extrator[18].

3.4 Efeito do tempo de extração

Na DLLME, apesar do equilíbrio de partição dos analitos entre a fase orgânica e a fase aquosa ser atingido muito rapidamente, na prática, o tempo de extração é definido como o intervalo entre a injeção da mistura dos solventes extrator e dispersor na fase aquosa e o final da centrifugação. Este também deve ser otimizado e é um dos parâmetros mais importantes em técnicas de microextração[3,20,21].

3.5 Efeito da adição de sais e do ajuste do pH

A influência da força iônica também deve ser considerada, uma vez que influencia na separação das fases. O aumento na concentração de NaCl aumenta o volume de fase sedimentada, devido à diminuição da solubilidade do solvente extrator na presença de um sal. Esta influência será de acordo com as características de cada analito. Observa-se, nos trabalhos publicados, uma grande variação da adição de NaCl, desde a não utilização até a adição de 0,5 a 30%. Outro parâmetro que deve ser levado em consideração é o pH, que é otimizado em função da acidez ou basicidade de alguns compostos. O ajuste do pH do meio permite que os analitos permaneçam na forma neutra, facilitando a partição dos analitos nas microgotas do solvente extrator[21]. No trabalho desenvolvido por Farhadi et al.[22], o pH da amostra foi ajustado em 1,5 para extração de herbicidas da classe dos clorofenoxiacéticos em amostras de água. A amostra com pH 1,5 e 10% NaCl foi extraída com 1 mL acetona (dispersor) e 25 µL de clorobenzeno (extrator). Recuperações entre 94 e 102,9% foram obtidas em águas de poço e de torneira, com limite de detecção (LOD) de 0,16 $\mu g.L^{-1}$.

4 Aplicações

A DLLME tem sido aplicada com sucesso nas etapas de extração e pré-concentração de uma grande variedade de compostos orgânicos e íons metálicos. A Tabela 2 apresenta as características de algumas aplicações da DLLME para amostras ambientais. Entre os analitos avaliados nestas aplicações pode-se destacar agrotóxicos, fármacos e outros poluentes orgânicos. Como pode ser observado, a DLLME é uma técnica de preparo de amostra bastante versátil, uma vez que os extratos obtidos podem ser empregados com sucesso em distintos métodos de análise.

A determinação de compostos orgânicos em alimentos é bastante complexa devido à presença de coextrativos que podem afetar o resultado final. Entre os problemas que podem ser observados estão: baixa robustez do método, diminuição da detectabilidade e quantificação imprecisa, uma vez que resultados falsos positivos ou falsos negativos podem ser obtidos. Desta maneira, atenção especial vem sendo dada a métodos de preparo de amostra que minimizem o efeito destes coextrativos. Como pode ser observado na Tabela 3, a técnica DLLME tem sido aplicada com sucesso na análise de diferentes compostos orgânicos em alimentos.

Na grande maioria das aplicações apresentadas nas Tabelas 2 e 3, os solventes de extração empregados são clorados. O emprego destes sol-

Tabela 2 Aplicações de DLLME em amostras ambientais.

Analitos/matriz	Solvente extrator (volume)	Solvente dispersor (volume)	Técnica de determinação	Fator de pré-concentração	LOD	% Recuperação (RSD%)	Ref.
Hormônios em água	Tetracloreto de carbono (80 μL)	Acetona (1,25 mL)	UHPLC-UV	71,0-78,5	0,008-0,010 $\mu g.L^{-1}$	85,2-94,2 (2,4-3,2)	19
Herbicidas do grupo das fenilureias em água	Diclorometano (60 μL)	Tetra-hidrofurano (1,0 mL)	HPLC-UV	68-126	0,10-0,28 $\mu g.L^{-1}$	91,2-104,1 (0,4-2,3)	23
Disruptores endócrinos em água	Cloreto de 1-butil-3-metilimidazolium (38 μL)	-	UHPLC-UV	140-989	0,8-4,8 $\mu g.L^{-1}$	90,2 (11)	24
Aldeídos em água	Clorobenzeno (20 μL)	Etanol (1,0 mL)	GC-MS	-	0,16-0,23 $\mu g.L^{-1}$	85-105 (1,8-10,2)	25
Orto-, meta- e para-mononitrotolueno em água	Tetracloroetileno (11 μL)	Acetonitrila (1,0 mL)	SPE-DLLME-GC-FID	4141-4570	0,2 $\mu g.L^{-1}$	85-118 (2,0-6,4)	26
Estatinas em águas e efluentes	Clorobenzeno (50 μL)	Acetona (0,5 mL)	HPLC-Q-TOF	-	0,10-17,0 $ng.L^{-1}$	19-93 (3,4-12,0)	27
Triclosan, triclocarban e metil-triclosan em água	Diclorobenzeno (15 μL)	Tetra-hidrofurano (1,0 mL)	UHPLC-UV	210-234	45,1-236 $ng.L^{-1}$	64,3-121/ (3,93-21,7)	28
Fuoroquinolonas em água	Clorofórmio (685 μL)	Acetonitrila (1,25 mL)	CE-UV	-	1,6-155 $\mu g.L^{-1}$	87-108 (3,3-9,3)	29

[C4MIM][BF4]: 1butil-3-metilimidazoliumtetrafluoroborato; [C8MIM][PF6]: 1-octil-3-metilimidazolium hexafluorofosfate; [BBim][PF6]: 1,3-dibutilimidazolium hexafluorofosfato. GC: Gas Chromatography; MS: Mass Spectrometry; FID: Flame Ionization Detector; Q-TOF: Quadrupole-time-of-flight; UV: Ultraviolet; DAD: Diode Array Detection; CE: capillary electrophoresis; LC: Liquid Chromatography; MS/MS: tandem Mass Spectrometry; FD: Fluorescence Detector.

Tabela 2 Continuação...

Analitos/matriz	Solvente extrator (volume)	Solvente dispersor (volume)	Técnica de determinação	Fator de pré-concentração	LOD	% Recuperação (RSD%)	Ref.
Analgésicos em água e em fluídos biológicos	Clorofórmio (162 μL)	Metanol (2,0 mL)	HPLC-DAD	275-325	0,4-1,9 μg L^{-1}	11-49 (5,4-12,8)	30
Sulfonamidas em água	Clorobenzeno (400 μL)	Dimetilsulfóxido (0,8 mL)	CE	-	0,020-0,570 mg.L^{-1}	53,6-94,0 (1,23-5,60)	31
Carbofuran, clomazone e tebuconazole em água	Tetracloreto de carbono (60 μL)	Acetonitrila (2,0 mL)	LC-MS/MS	50	0,02 μg.L^{-1}	62,7-120,0 (1,9-9,1)	32
Carbamatos em água	Tolueno (15 μL)	Acetonitrila (0,5 mL)	GC-MS/MS	-	0,001-0,50 μg.L^{-1}	94,5-104 (2,3-6,8)	33
Organofosforados em água e frutas	[BBim][PF_6] (0,062 g)	Metanol (0,5 mL)	HPLC-UV	300	0,01-0,05 μg.L^{-1}	92,7-109,1 (1,3-2,7)	34
Piretroides em água	[C_4MIM][BF_4] (300 μL)	[C_8MIM][PF_6] (0,05 mL)	HPLC-UV	-	0,28-0,83 μg.L^{-1}	84,1-113,5/ (4,65-7,78)	35
Cu(II) e Zn(II) em Água	Clorofórmio (250 μL)	Metanol (1,5 mL)	HPLC-UV	25,2-31,6Cu 46,1-51,9Zn	3 μg.L^{-1}	48-61/(2,9) Cu 91-99/(5,7) Zn	36
Pesticidas e metabolitos em solo	1-hexil-3-metilimidazolium hexafluorofosfato (117,5 mg)	Metanol (0,418 mL)	HPLC-FD	-	0,02-16,7 μg.L^{-1}	80-119 (–)	37

[C4MIM][BF4]: 1butil-3-metilimidazoliumtetrafluoroborato; [C8MIM][PF6]: 1-octil-3-metilimidazolium hexafluorofosfate; [BBim][PF6]: 1,3-dibutilimidazolium hexafluorofosfato. GC: Gas Chromatography; MS: Mass Spectrometry; FID: Flame Ionization Detector; Q-TOF: Quadrupole-time-of-flight; UV: Ultraviolet; DAD: Diode Array Detection; CE: capillary electrophoresis; LC: Liquid Chromatography; MS/MS: tandem Mass Spectrometry; FD: Fluorescence Detector.

Tabela 3 Aplicações de DLLME em amostras de alimentos.

Analito (matriz)	Solvente dispersor (volume)	Solvente extrator (volume)	Técnica de determinação	Fator de pré-concentração	LOD ($\mu g.L^{-1}$ ou $\mu g.kg^{-1}$)	% Recuperação (RSD%)	Ref
Bifenilas policloradas e éteres difenílicos polibromados (leite)	Acetona (1 mL)	Clorobenzeno (19 μL)	GC-MS	274,0-554,0	0,01-0,4	74,0-131,8 (1,12-17,4)	38
Bifenilas policloradas (peixe)	Acetona (1 mL)	Clorobenzeno (30 μL)	GC-ECD	87,0-123,0	0,12-0,35	81,2-108,4 (1,0-9,2)	39
Agrotóxicos organofosforados (chá)	Acetonitrila (2 mL)	Hexano (24 μL)	GC-FPD	-	0,03-1,0	83,3-117,4 (3,0-7,8)	40
Parabenos (panquecas)	Acetonitrila (0,1 mL)	1-octil-3-metil-imidazolium hexafluorfosfato (100 μL)	HPLC-UV	68,2-90,4	1,0-1,5	60,1-79,5 (1,8-7,0)	41
Micotoxinas (cereais)	Metanol (0,1 mL)	Diclorometano (220 μL)	HPLC-FD	2,5	0,01-0,17	67,0-90,0 (1,0-18,0)	42
Colesterol (leite, ovos e azeite de oliva)	Etanol (0,8 mL)	Tetracloreto de carbono (35 μL)	HPLC-UV	-	0,01	95,0-105,0 (1,0-2,97)	43
Agrotóxicos organofosforados (melancia e pepino)	Acetonitrila (1,0 mL)	Clorobenzeno (27 μL)	GC-FPD	41,0-50,0	0,01-0,19	67,0-111,0 (2,0-9,0)	44
Agrotóxicos multiclasse (vinho)	Acetona (0,5 mL)	1-undecanol (50 μL)	GC-MS	8,0-86,0	-	81,0-120,0 (1,0-13,0)	45

GC: Gas Chromatography; ECD: Electron Capture Detection; FPD: Flame Photometric Detection; FID: Flame Ionization Detection.

Tabela 3 Continuação...

Analito (matriz)	Solvente dispersor (volume)	Solvente extrator (volume)	Técnica de determinação	Fator de pré-concentração	LOD ($\mu g.L^{-1}$ ou $\mu g.kg^{-1}$)	% Recuperação (RSD%)	Ref
Clorofenóis e haloanisóis (vinho)	Acetona (1,0 mL)	Tetracloreto de carbono (30 μL)	GC-MS	-	0,004-0,108	81,0-119,0 (≤15,2)	46
Agrotóxicos multiclasse (suco de maçã)	Acetona (0,4 mL)	Tetracloreto de carbono (100 μL)	GC-MS	-	0,06-2,2	60,0-106,0 (1,0-20,0)	47
Triazofós e carbaril (água e suco de frutas)	Acetonitrila (1 mL)	Tetracloetano (100 μL)	HPLC-FD	87,3-275,6	12,3-16,0	80,4-17,9 (1,11-9,38)	48
Parabenos (água, folhas de chá verde, chá verde e bebida)	Acetona (0,5 mL)	Clorobenzeno (13 μL)	GC-MS	46,0-240,0	Água (0,99-3,05) Folhas de chá (850-4100) chá verde (200-300) bebida (33-76)	73,6-106,3 (1,2-11,9)	49
Agrotóxicos triazínicos (mel)	1-hexil-3metil imidazolium hexafluorfosfato (175 μL)	Triton X 114 (0,05%)	HPLC-DAD	-	5,31-8,59	60,1-133,0 (0,4-16,5)	50
Agrotóxicos triazóis (leite e água)	Acetonitrila (1 mL)	Clorofórmio (40 μL)	GC-FID	156,0-435,0	3,0-58,0	45,0-96,0	51
Fenóis (vinho)	Acetona (1 mL)	Tetracloreto de carbono (50 μL)	GC-MS	-	28,0-44,0	-	52

GC: Gas Chromatography; ECD: Electron Capture Detection; FPD: Flame Photometric Detection; FID: Flame Ionization Detection.

ventes é criticado devido a sua toxicidade. No entanto, a quantidade de solventes usados em DLLME é muito reduzida. Embora a DLLME tenha sido proposta para solventes mais densos do que a água, Rodriguéz-Cabo et al.[45] desenvolveram uma nova proposta para a determinação de resíduos de fungicidas em vinho, empregando 50 µL de 1-undecanol como solvente de extração. Este solvente caracteriza-se por ser não clorado e de menor densidade que a água. Os 10 analitos de interesse foram analisados por GC-MS (do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry)*. O método apresentou RSD% inferiores a 13% e os valores de LOQ variaram entre 0,2 e 3,2 $\mu g.L^{-1}$. Os valores de recuperação obtidos estão na faixa de 81 e 120%, com fatores de pré-concentração entre 8 e 86 vezes.

Os excelentes resultados obtidos com a utilização da técnica de DLLME também podem ser observados quando esta é combinada a outras técnicas de preparo de amostras. Yan et al.[53] empregaram DLLME combinada com a técnica de Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*) para a determinação de corantes do tipo Sudão em amostras de gema de ovo por HPLC-UV (do inglês *High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection*). Durante o procedimento de MSPD a amostra foi diretamente misturada com um polímero de impressão molecular (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*) formado por anilina e naftol. Uma mistura de acetona:ácido acético (95:5, v/v) foi empregada como solvente de eluição na MSPD e, após, como solvente de dispersão na DLLME. O método apresentou boa linearidade, suas recuperações em três níveis de fortificação variaram entre 87,2 e 103,5%, com RSD% ≤6,1. Os valores de LODs do método variaram entre 2,9 e 6,7 $\mu g.kg^{-1}$, demonstrando o bom desempenho da combinação entre as técnicas de MIPs-MSPD e DLLME.

O uso de ultrassom para facilitar a extração também tem sido empregado. Os estudos relatam que o uso do ultrassom aumenta a eficiência de extração, uma vez que microgotas menores são produzidas quando a vibração ultrassônica é empregada. A UA-DLLME *(ultrasound-assisted-*-DLLME) foi utilizada no trabalho desenvolvido por Chen et al.[54] que descrevem um método simples e com baixo consumo de solventes para a determinação de fulerenos em amostras de água. Os compostos foram determinados por LC-APPI-MS/MS. O método consistiu na injeção de 1 mL de 2-propanol (dispersor) e 10 µL de brometo de benzila (extrator) em 10 mL da amostra pH 10, contendo 1% de NaCl. As amostras foram submetidas ao ultrassom por 1 minuto, depois foram centrifugadas e 5 µL da fase sedimentada foi injetado. O método apresentou valores de LOQ entre 8 e 150 $ng.L^{-1}$, com precisão menor que 12% e exatidão entre 70 e 86%.

Apesar das importantes vantagens da técnica DLLME anteriormente citadas, a dificuldade de automação, devido à necessidade de etapas de separação de fases e centrifugação, é considerada uma desvantagem. A fim de minimizar este problema, Andruch et al.[55] propuseram a combinação entre um sistema de injeção sequencial de análise (SIA, do inglês *Sequencial Injection Analysis*) e a técnica de DLLME para a determinação de tiocianato em amostra de saliva empregando detector espectrofotométrico. Os resultados obtidos demonstram a eficiência do sistema proposto, sendo que a combinação SIA-DLLME apresentou LOD de 17,0 $\mu g.L^{-1}$, e o método convencional por DLLME apresentou LOD de 100,0 $\mu g.L^{-1}$. Além disso, outra grande vantagem desta combinação foi o tempo de 3 segundos para a realização da etapa de extração por DLLME.

A completa automação da técnica foi proposta por Maya et al.[56], empregando injeção em fluxo com multisseringas (MSFIA, *Multisyringe Flow Injection Analysis*) e solventes extratores menos densos que a água. Quando hifenado com

a Cromatografia Líquida, o método é compacto, simples, fácil de operar e rápido. A aplicação foi demonstrada para extração de benzopireno, utilizando 1-octanol (extrator) e acetonitrila (dispersor) na proporção (7,5/92,5, v/v).

5 Conclusões e perspectivas

Apesar de ser uma técnica de preparo de amostra relativamente nova, muitas modificações têm sido introduzidas desde sua proposição em 2006. Inicialmente foi utilizada para preparo de amostras para GC e posteriormente para LC, FAAS (do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*), GF-AAS (do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*). As modificações em relação ao procedimento original incluem a utilização de líquidos iônicos e de solvente extratores com densidade menor que a da água. Algumas publicações relatam o desenvolvimento de DLLME com derivação e/ou complexação simultânea e extração de íons metálicos com o auxílio de agentes quelantes[57].

A DLLME tem sido utilizada com maior frequência para extração e pré-concentração de agrotóxicos em amostras aquosas. Também tem sido utilizada para extração de analitos orgânicos, como produtos farmacêuticos, aminas, fenóis e outros em amostras aquosas e alimentos[58].

A DLLME quando combinada a outras técnicas visando a pré-concentração dos analitos de interesse é uma alternativa à etapa de evaporação do extrato. Desta forma, diminui a variação da eficiência do processo de extração, principal fonte de incerteza do preparo de amostras.

Em conjunto com outras técnicas de preparo de amostra, a DLLME pode ser utilizada para a extração de analitos de amostras sólidas. Algumas publicações relatam este tipo de aplicação, na qual os analitos são extraídos da matriz, utilizando a extração sólido-líquido, empregando o método QuEChERS, ou, no caso de metais, a mineralização[36]. Neste caso, a DLLME é utilizada para concentrar os extratos. Outra tendência que pode ser observada em publicações recentes é o uso da DLLME em conjunto com a SPE (do inglês *Solid Phase Extraction*), com a extração por fluído supercrítico e com a SBSE (do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*). Estas modificações permitem a obtenção de maior seletividade e menores valores de LOD[58].

Uma tendência de uso da DLLME, ainda com poucas aplicações descritas na literatura, é a utilização de sorventes em suspensão em amostras submetidas à DLLME. Exemplos deste tipo de aplicação são o emprego de MIPs[53,59], que são posteriormente removidos da amostra por filtração, e o emprego de nanopartículas magnéticas quimicamente modificadas[60], que são removidas por um campo magnético. Conforme sugerido por Grzeskowiak e Grzeskowiak.[57], a combinação destas duas ideias, ou seja, nanopartículas de MIP com núcleos magnéticos, pode trazer alta seletividade e facilidade de uso à DLLME com utilização de sorventes sólidos em suspensão.

A automação da DLLME deve ser uma tendência no futuro, atualmente poucos artigos relatam o desenvolvimento de um procedimento analítico utilizando DLLME *on-line*[55,56].

As considerações descritas neste artigo sugerem uma perspectiva promissora nas aplicações da DLLME. A versatilidade desta técnica irá permitir sua aplicação para a extração de diferentes tipos de analitos nas mais variadas amostras.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) o apoio financeiro e bolsas concedidas.

Referências

1 Ojeda CB, Rojas FS. Separation and Preconcentration by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Procedure: Recent Applications. *Chromatographia* 2011; 74:651-679. http://dx.doi.org/10.1007/s10337-011-2124-1

2 Rezaee M, Assadi Y, Hossein MM, Aghaee E, Ahmadia F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal Chromatography A* 2006; 1116:1-9. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007

3 Rezaee M, Yamini Y, Faraji M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A* 2010; 1217:2342-2357. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.088

4 Yazdi AS, Amiri A. Liquid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry* 2010; 29(1):1-14. http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2009.10.003

5 Berijani S, Assadi Y, Anbia M, Hosseini MRM, Aghaee E. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. *Journal of Chromatography A* 2006; 1123:1-9. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.010

6 Oliveira ARM, Magalhães IRS, Santana FJM, Bonato PS. Microextração em Fase Líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. *Química Nova* 2008; 31(3):637-644. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000300003

7 Harris DC. *Análise Química Quantitativa*. 8th ed. Rio de Janeiro: LTC; 2012. 886 p.

8 Bjergaard SP, Rasmussen KE. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. *Journal Chromatography A* 2008; 1184:132-142. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.088

9 Ho TS, Vasskog T, Anderssen T, Jensen E, Rasmussen KE, Bjergaard SP. 25,000-fold pre-concentration in a single step with liquid-phase microextraction. *Analytica Chimica Acta* 2007; 592:1-8. http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2007.04.014

10 Kozani RR, Assadi Y, Shemirani F, Hosseini MRM, Jamali MR. Part-per-trillion determination of chlorobenzenes in water using dispersive liquid-liquid microextraction combined gaschromatography-electron capture detection. *Talanta* 2007; 72:387-393. http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2006.10.039

11 Herrera-Herrera AV, Asensio-Ramos M, Hernandez-Borges J, Rodriguez-Delgado MA. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. *Trends in Analytical Chemistry* 2010; 29(7):728-751. http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2010.03.016

12 Zang XH, Wu QH, Zhang MY, Xi GH, Wang S. Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 2009; 37(2):161-168. http://dx.doi.org/10.1016/S1872-2040(08)60082-1

13 Merck Chemicals. *Solventes para Cromatografia Líquida*. Lichrosolv. [cited feb 2012]. Available from: http://www.merck-chemicals.com/brazil/copy-of-solventes-para-cromatografia-liquida-lichrosolv-/c_3xab.s1OK68AAAEuBEdQn6U9.

14 Anthemidis AN, Ioannou KIG. Recent developments in homogeneous and dispersive liquid-liquid extraction for inorganic elements determination. A review. *Talanta* 2009; 80:413-421. http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.09.005

15 Liu L, Cheng J, Matsadiq G, Zhou H, Li J. Application of DLLME to the Determination of Pyrethroids in Aqueous Samples. *Chromatographia* 2010; 72:1017-1020. http://dx.doi.org/10.1365/s10337-010-1732-5 0009-5893/10/11

16 Leong M, Huang S. Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* 2008; 1211:8-12. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.111

17 Leong MI, Chang CC, Fuh MR, Huang SD. Low toxic dispersive liquid-liquid microextraction using halosolvents for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Journal of Chromatography A* 2010; 1217:5455-5461. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.06.056

18 Krylov VA, Krylov AV, Mosyagin PV, Matkivskaya YO. Liquid-Phase Microextraction Preconcentration of Impurities. *Journal of Analytical Chemistry* 2011; 66(4):331-350. http://dx.doi.org/10.1134/S1061934811040101

19 Hadjmohammadi MR, Ghoreishi SS. Determination of Estrogens in Water Samples Using Dispersive

Liquid Liquid Microextraction and High Performance Liquid Chromatography. *Acta Chimica Slovenica* 2011; 58:765-771.

20 Nagaraju D, Huang SD. Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2007; 1161:89-97. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.065

21 Caldas SS, Gonçalves FF, Primel EG, Prestes OD, Martins ML, Zanella R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova* 2011; 34(9):1604-1617. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000900021

22 Farhadi K, Matin AA, Hashemi P. LC Determination of Trace Amounts of Phenoxyacetic Acid Herbicides in Water after Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. *Chromatographia* 2009; 69:45-49. http://dx.doi.org/10.1365/s10337-008-0815-z0009-5893/09/01

23 Chou T, Lin S, Fuh M. Determination of phenylurea herbicides in aqueous samples using partitioned dispersive liquid-liquid microextraction. *Talanta* 2009; 80:493-498. http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.07.005

24 López-Darias J, Pino V, Ayala JH, Afonso AM. In-situ ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction method to determine endocrine disrupting phenols in seawaters and industrial effluents. *Microchimica Acta* 2011; 174:213-222. http://dx.doi.org/10.1007/s00604-011-0636-x

25 Ye Q, Zheng D, Liu L, Hong L. Rapid analysis of aldehydes by simultaneous microextraction and derivatization followed by GC-MS. *Journal of Separation Science* 2011; 34:1607-1612. http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201100145

26 Sobhi HR, Farahani H, Kashtiaray A, Farahani MR. Tandem use of solid-phase extraction and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of mononitrotoluenes in aquatic environment. *Journal of Separation Science* 2011; 34:1035-1040. http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201000529

27 Martín J, Buchberger W, Alonso E, Himmelsbach M, Aparicio I. Comparison of different extraction methods for the determination of statin drugs in wastewater and river water by HPLC/Q-TOF-MS. *Talanta* 2011; 85:607-615. http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.04.017

28 Guo J, Li X, Cao X, Li Y, Wang X, Xu X. Determination of triclosan, triclocarban and methyl-triclosan in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with rapid liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2009; 1216:3038-3043. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.021

29 Herrera-Herrera AV, Hernandez-Borges J, Borges-Miquel T, Rodriguez-Delgado MA. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with nonaqueous capillary electrophoresis for the determination of fluoroquinolone antibiotics in Waters. *Electrophoresis* 2010; 31:3457-3465. http://dx.doi.org/10.1002/elps.201000285

30 Saraji M., Boroujeni MK, Bidgoli AAH. Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction and hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction for the determination of fentanyl, alfentanil, and sufentanil in water and biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2011; 400:2149-2158. http://dx.doi.org/10.1007/s00216-011-4874-x

31 Wen Y, Li J, Zhang W, Chen L. Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with capillary electrophoresis for simultaneous determination of sulfonamides with the aid of experimental design. *Electrophoresis* 2011; 32:2131-2138. http://dx.doi.org/10.1002/elps.201100142

32 Caldas SS, Costa FP, Primel EG. Validation of method for determination of different classes of pesticides in aqueous samples by dispersive liquid liquid microextraction with liquid chromatography tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* 2010; 32:55-62 http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.03.004

33 Chen H, Chen R, Li S. Low-density extraction solvent-based solvent terminated dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of carbamate pesticides in water samples. *Journal of Chromatography A* 2010; 1217:1244-1248. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.062

34 HeL; LuoX; JiangX, QuL. A new 1,3-dibutylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction to determine organophosphorus pesticides in water and fruit samples by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2010; 1217:5013-5020. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.05.057

35 Zhao R, Wang X, Li F, Wang S, Zhang L, C Cheng. Ionic liquid/ionic liquid dispersive liquid-

liquid microextraction. *Journal of Separation Science* 2011; 34:830-836. http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201000802

36 Farajzadeh MA, Bahram M, Vardast MR. Central Composite Design Applied to Optimization of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction of Cu(II) and Zn(II) in Water Followed by High Performance Liquid Chromatography Determination. *CLEAN - Soil, Air, Water* 2010; 38(5-6):466-477. http://dx.doi.org/10.1002/clen.200900257

37 Asensio-Ramos M, Hernandez-Borges J, Borges-Miquel TM, Rodriguez-Delgado MA. Ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of pesticides and metabolites in soils using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218:4808-4816. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.030

38 Liu X, Zhao A, Zhang A, Liu H, Xiao W, Wang C et al. Dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in milk. *Journal of Separation Science* 2011; 34:1084-1090. http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201000767

39 Hu Y, Li Y, Zhang W, Wang H, Huang C, Zhang M et al. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-electron capture detection for determination of polychlorinated biphenyls in fish. *Journal of Separation Science* 2009; 32:2103-2108. http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200900027

40 Moinfar S, Hosseini MRM. Development of dispersive liquid-liquid microextraction method for the analysis of organophosphorus pesticides in tea. *Journal of Hazardous Materials* 2009; 169:907-911. http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.04.030

41 Yang P, Ren H, Qiu H, Liu X, Jiang S. Determination of four trace preservatives in street food by ionic liquid-based dispersive liquid-liquid micro-extraction. *Chemical Papers* 2011; 65(6):747-753. http://dx.doi.org/10.2478/s11696-011-0071-9

42 Fu L, Liu X, Hu J, Zhao X, Wang H, Wang X. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of triazophos and carbaryl pesticides in water and fruit juice samples. *Analitica Chemica Acta* 2009; 632:289-295. http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.020

43 Daneshfar A, Khezeli T, Lotfi HJ. Determination of cholesterol in food samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV. *Journal of Chromatography B* 2009; 877:456-460. http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.12.050

44 Zhao E, Zhao W, Han L, Jiang S, Zhou Z. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in watermelon and cucumber. *Journal of Chromatography A* 2007; 1175:137-140. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.069

45 Cabo TR, Rodríguez I, Ramil M, Cela R. Dispersive liquid-liquid microextraction using non-chlorinated, lighter than water solvents for gas chromatography-mass spectrometry determination of fungicides in wine. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218:6603-6611. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.054

46 Campillo N, Viñas P, Cacho JI, Peñalver R, Córdoba MH. Evaluation of dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of chlorophenols and haloanisoles in wines and cork stoppers using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A 2010;* 1217:7323-7330. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.058

47 Cunha SC, Fernandes JO, Oliveira MBPP. Fast analysis of multiple pesticide residues in apple juice using dispersive liquid-liquid microextraction and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2009; 1216:8835-8844. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.10.051

48 Fu L, Liu X, Hu J, Zhao X, Wang H, Wang X. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of triazophos and carbaryl pesticides in water and fruit juice samples *Analityca Chimica Acta* 2009; 632:289-295. http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.020

49 Han Y, Jia X, Liu X, Duan T, Chen H. DLLME Combined with GC-MS for the Determination of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben and Butylparaben in Beverage Samples. *Chromatographia* 2010; 72:351-355. http://dx.doi.org/10.1365/s10337-010-1646-2 0009-5893/10/08

50 Wang Y, You J, Ren R, Xiao Y, Gao S, Zhang H et al. Determination of triazines in honey by dispersive liquid-liquid microextraction high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2010; 1217:4241-4246. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.03.031

51 Farajzadeh MA, Djozan D, Mogaddan MRA. Extraction and preconcentration technique for triazole pesticides from cow milk using dispersive liquid-liquid microextraction followed by GC-FID and GC-MS determinations. *Journal of Separations Science* 2011; 34:1309-1316. http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201000928

52 Fariña L, Boido E, Carrau F, Delacassa E. Determination of volatile phenols in red wines by dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* 2007;1157:46-50. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.006

53 Yan H, Wang H, Qiao J, Yang G. Molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion combined with dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of four Sudan dyes in egg yolk. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218:2182-2188 http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.042

54 Chen H, Ding W, Determination of aqueous fullerene aggregates in water by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2012; 1223:15-23. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.034

55 Andruch V, Acebal CC, Jkrlikova J, Sklenatova H, Solich P, Balogh IS et al. Automated on-line dispersive liquid-liquid microextraction based on a sequential injection system. *Microchemical Journal* 2012; 100:77-82. http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2011.09.006

56 Maya F, Estela JM, Cerdà V. Completely automated in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction using solvents lighter than water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012; 402:1383-1388. http://dx.doi.org/10.1007/s00216-011-5572-4

57 Grzeskowiak AZ, Grzeskowiak T. Dispersive liquid-liquid microextraction. *Trends in Analytical Chemistry* 2011; 30(9):1382-1399. http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2011.04.014

58 Asensio-Ramos M, Revelo-Perez LM, González-Curbelo MA, Hernandez-Borges J. Liquid phase microextraction applications in food analysis. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218:7415-7437. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.096

59 Ebrahimzadeh H, Abedi H, Yamini Y, Adlnasab L. Molecular-imprinted polymer extraction combined with dispersive liquid-liquid micro-extractionfor ultra-preconcentration of mononitrotoluene. *Journal of Separation Science* 2010; 33:3759-3766. http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201000376

60 Luo YB, Shi ZG, Gao Q, Fenga YQ. Magnetic retrieval of graphene: Extraction of sulfonamide antibiotics from environmental water samples. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218:1353-1358. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.022

Recebido: 08/03/2012
Aceito: 14/03/2012

Scientia Chromatographica 2012; 4(1):52-76
Instituto Internacional de Cromatografia
http://dx.doi.org/10.4322/sc.2012.005
ISSN 1984-4433

Morango: uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna

Daniele Oshita, Isabel Cristina Sales Fontes Jardim*

Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Cep 13083-970, Campinas, SP, Brasil
e-mail: icsfj@iqm.unicamp.br

Resumo

A presente revisão tem como objetivo reunir em um único manuscrito informações desde a produção agrícola do morango até os aspectos negativos que podem influenciar e atingir o meio ambiente ou gerarem preocupações com a saúde dos trabalhadores rurais e consumidores que tenham contato direto com o meio ambiente ou que consomem o morango *in natura*. O morango é uma das culturas que lideram, desde o ano de 2002, o *ranking* dos alimentos mais contaminados por resíduos de agrotóxicos no Brasil. A cromatografia líquida moderna é uma das técnicas analíticas mais desenvolvidas e empregadas para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

Palavras-chave

CLAE; agrotóxicos; morango.

Strawberry: food, environmental and sanitary concerns, monitored by modern liquid chromatography

Abstract

This review aims to present information in a single manuscript initiating with the agricultural production of strawberries and concluding with the negative aspects that influence environment or generate concerns about the health of farm workers and consumers who have direct contact with the environment or, even the consumers of fresh strawberries. Strawberry crops are those that leads, since the year 2002, the ranking of the foods most contaminated with pesticide residues in Brazil. Modern liquid chromatography is one of the most developed analytical techniques and is thus often employed for the determination of pesticide residues in foods.

Keywords

HPLC; pesticides; strawberry.

1 Introdução

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das técnicas analíticas mais desenvolvidas e empregadas na academia, em diversos tipos de pesquisa e em indústrias, nas análises de rotina e de controle de qualidade. A grande aplicabilidade da CLAE para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos se justifica por esta ser uma técnica de separação eficaz e, juntamente com um detector adequado, permitir a identificação, quantificação e, quando necessário, a confirmação do analito.

Nos últimos anos, tem-se observado grande crescimento e investimento, pelos órgãos de pesquisas científicas, governamentais e de empresas privadas, nos estudos de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Esse interesse na área de resíduos está relacionado com o impacto ambiental que a produção agrícola pode gerar no meio ambiente, atingindo ar, solo e água. Acrescido a isto, os consumidores estão mais conscientes e interessados nas consequências que o consumo de um alimento contaminado pode causar à saúde. Esta contaminação tem origem, muitas vezes, em uma produção agrícola que não segue adequadamente as Boas Práticas Agrícolas (BPA). Além disso, deve-se considerar que a exportação de alimentos ocorre em função da qualidade dos produtos nacionais e das exigências do comércio exterior.

O morango, cada vez mais, vem se destacando por estar presente na lista dos alimentos mais contaminados por resíduos de agrotóxicos no Brasil, por vários anos consecutivos; ter consumo elevado, principalmente *in natura*, por crianças e adultos; possuir propriedades funcionais diversificadas e por ser bastante usado na culinária. O estudo de resíduos de agrotóxicos no morango constitui uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, que pode envolver toda a população consumidora ou não e os seres vivos que compartilham o mesmo ambiente da produção agrícola desse fruto ou aqueles para os quais os agrotóxicos foram lixiviados.

2 Morango e suas propriedades físico-químicas

As frutas são alimentos essenciais em uma dieta equilibrada e balanceada, pois são fontes importantes de vitaminas e minerais que são nutrientes indispensáveis para uma vida saudável. O morangueiro pertence à família das Rosáceas e ao gênero (*Fragaria* × *ananassa* Duch.); a parte comestível é formada por um receptáculo carnoso e suculento, de coloração vermelha viva, formando um pseudofruto. Os frutos verdadeiros são os aquênios, estruturas diminutas, que contêm as sementes presas ao receptáculo. Este fruto é produzido e apreciado em várias regiões do mundo, sendo uma das espécies de grande evidência e de maior expressão econômica entre as frutas pequenas, por seu alto consumo mundial[1-4].

Os consumidores apreciam a coloração, o aroma, o sabor e as propriedades nutritivas do morango, o que aumenta o seu poder de comercialização em muitos países. O maior consumo de morango ocorre *in natura,* mas pode ser industrializado como geleia, caldas, polpas para sucos, iogurtes e sorvetes[5].

O morango, como alimento, possui 2,3% de fibras, 92,8% de água e 39 calorias em 100 gramas de frutos, vitaminas A, B1, B2, B3 e C, elementos minerais como potássio, sódio, cálcio, ferro e fósforo, ácido fólico e também é rico em frutose e sacarose e pobre em carboidratos[6]. Quando o morango é consumido numa refeição bem balanceada, há uma reação química que triplica os índices de absorção de ferro presente nos vegetais, ovos e carnes[7].

O morango possui elevado poder antioxidante, associado aos compostos fenólicos e pigmentos, que são representados pelas antocianinas, metabólitos pertencentes à classe dos flavonoides. A atividade antioxidante das antocianinas provém da sua estrutura química formada por três anéis que possuem ligações duplas conjugadas e por hidroxilas distribuídas ao longo da estrutura, que possibilitam o sequestro de radicais livres, causadores de danos celulares e de doenças degenerativas[8]. O morango também contém uma quantidade elevada de ácido elágico, um constituinte com propriedades antimutagênicas e anticancerígenas. Devido à presença dessas variedades de componentes naturais, o morango é capaz de atuar na prevenção e/ou na cura de várias doenças e é considerado antioxidante, anticarciogênico, antineurodegenerativo, anti-inflamatório, diurético, laxativo e previne doenças coronarianas[5,9-11].

2.1 Dificuldades na pré-colheita, colheita e pós-colheita do morango

A colheita do morango é uma das operações mais delicadas e importantes de todo o ciclo da cultura, porque os frutos do morangueiro são altamente perecíveis, muito delicados e pouco resistentes em virtude da epiderme delgada, grande porcentagem de água e alto metabolismo. Quando colhidos muito maduros, poderão chegar ao mercado em decomposição e com podridões; ou quando colhidos ainda verdes, terão alta acidez, adstringência e ausência de aroma. Em ambos os casos, o produto possui baixo valor comercial[7,12]. Os morangos possuem vida útil curta pós-colheita, devido à rápida deterioração causada por fungos, à elevada taxa respiratória e ao aumento da produção de etileno, mesmo quando armazenados sob refrigeração[2]. Esta taxa elevada de perecibilidade requer cuidados quanto à embalagem, transporte e conservação.

Existem vários tratamentos[13] que podem ser aplicados na conservação dos morangos *in natura*: (i) a imersão em uma solução contendo cloreto de cálcio em até 1%, para manter a firmeza e aumentar o conteúdo de cálcio e de sólidos solúveis; (ii) o processo de irradiação,[2] no qual a exposição a baixas doses de radiação pode diminuir a velocidade de amadurecimento e de envelhecimento de frutas e vegetais; (iii) a manutenção dos morangos em embalagens, por meio do aumento da espessura do filme que diminui as trocas gasosas, e com concentrações elevadas de CO_2 ocasionam aumento ou a manutenção da firmeza do morango, reduzem a incidência de fungos, diminuem as taxas respiratórias e a produção de etileno; (iv) o uso da refrigeração associado a um controle da atmosfera que é uma técnica promissora e de baixo custo que minimiza as perdas de qualidade e peso, e a degradação por micro-organismos. Porém, esses frutos processados minimamente podem apresentar menor teor de antocianinas que os mantidos em atmosfera ambiente[14,15]. Outra maneira de obter um processamento mínimo do morango é a sanificação que contribui para a redução de micro-organismos alteradores e melhora a condição higiênico-sanitária dos alimentos. Encontram-se disponíveis para a sanificação compostos à base de cloro, amplamente utilizados em função do custo, da disponibilidade e maior atividade germicida; e sanificantes alternativos como o peróxido de hidrogênio[16,17].

As dificuldades existentes na etapa de produção ocasionam desde perdas nutritivas até econômicas, pois os consumidores não compram frutos com um aspecto físico ruim.

2.2 Produção agrícola do morango

O Brasil, depois da China e da Índia, é o 3° maior produtor de frutas do mundo, que é uma das atividades agrícolas mais importantes para o

País. A maior porcentagem da produção é destinada para o consumo interno e apenas, aproximadamente, 2% da produção é exportada[18,19]. Anualmente, desde a última década, a produção nacional do morango tem aumentado em média 6,3%, em comparação aos 3,7% para outras frutas e vegetais nesse mesmo período[20].

Os seis principais países em produção e produtividade de morango são, respectivamente, Estados Unidos (740.800 t; 41 t ha^{-1}), Espanha (306.000 t; 38 t ha^{-1}), Japão (200.000 t; 25 t ha^{-1}), Itália (172.600 t; 23,5 t ha^{-1}), Coreia do Sul (151.200 t; 20,5 t ha^{-1}) e Polônia (145.000 t; 3 t ha^{-1}). A produção brasileira alcançou um volume superior a 90.000 t em 1999 e a produtividade média da cultura no Brasil é de 25 t ha^{-1}[5]. Embora o Brasil não figure entre os maiores produtores, sua produção vem crescendo, concentrando-se principalmente nos Estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná e Distrito Federal. Os três primeiros Estados produzem aproximadamente 80% do morango brasileiro[1,5,6,8,21,22].

No Brasil, a produção de morango encontra-se difundida em regiões de clima temperado e subtropical, que se destacam pela alta rentabilidade por área e demanda intensa de mão de obra[1,23]. A produção é quase toda voltada para o mercado doméstico, sendo cerca de 70% destinada ao consumo *in natura* e 30% industrializada de diversas formas[24].

A produção do morango tem tendência crescente devido ao alto consumo, porém tem deparado com muitas dificuldades, sendo as principais: incidência de pragas e doenças (28%); aquisição de mudas (24%); custo de embalagens (24%); necessidade de mão de obra (19%); e custos de produção elevados (5%)[25].

A sazonalidade da produção de morangos no Brasil é um dos principais problemas da cultura, pois esses pseudofrutos em época de entressafra têm seu preço elevado. Embora cresçam melhor em regiões mais frias, os morangueiros podem se desenvolver bem em clima quente e seco. Segundo Ronque (*apud* Tessarioli Neto et al.)[26], a produção do morango é dependente de fatores climáticos, sendo de maior expressão a temperatura e o fotoperiodismo, e de menor intensidade a estiagem, chuvas excessivas, umidade e intensidade da luz. Devido a esses empecilhos, há grande busca por novas e melhores técnicas de cultivo e tipo de cultivar, para aumentar a produtividade e a lucratividade dessa cultura. Os métodos de cultivos utilizados são: convencional, orgânico e hidropônico, a céu aberto ou em cultivo protegido[1,3].

O cultivo em ambiente protegido ocorre com controle de temperatura e umidade, proteção contra ventos, granizos, chuvas e geadas, e resulta em menor incidência de doenças fúngicas e bacterianas, devido à redução da umidade foliar[27]. A hidroponia surgiu como uma técnica altamente racional, na qual se consegue a otimização do uso de água, do espaço, do tempo e dos nutrientes. Essa alternativa pode sanar problemas como, escassez de mão de obra, qualidade dos pseudofrutos e baixa lucratividade e promover o aumento da produção e qualidade dos frutos[26,28,29].

Uma alternativa para manter a qualidade do alimento e amenizar os impactos ambientais é a Produção Integrada (PI), que é um sistema que está entre a produção convencional e orgânica, gerando alimentos de qualidade, mediante o uso de recursos naturais e métodos ecologicamente corretos e seguros, nos quais se minimizam a aplicação de insumos e contaminantes para assegurar a sustentabilidade ambiental, segurança alimentar e viabilidade econômica[30]. Na PI, o uso de agrotóxicos é restrito a acaricidas seletivos ou específicos, com baixa persistência, que não deixem resíduos nos frutos, e a manutenção

da cultura pode ser realizada pelo controle químico, biológico ou cultural, que reduzem a ação das pragas e, consequentemente, diminuem a quantidade de agrotóxicos aplicados no campo.

O cultivo sem solo, em ambiente protegido, sobre bancadas ou suportes acima do nível do solo, é outra alternativa para amenizar os graves problemas na produção do morango[31]. Essa técnica diminui ou elimina os problemas sanitários de contaminação dos solos por patógenos, reduz os impactos ambientais, aumenta a produtividade e a qualidade das frutas e diminui os custos na plantação. O cultivo do morangueiro sem solo está bem difundido na Europa, porém, no Brasil, ainda é incipiente por falta de pesquisas que permitam a sua adaptação nas regiões produtivas do País[5].

Outro parâmetro que pode influenciar a produção são os cátions disponíveis no solo, sendo que o potássio age no controle das reações de síntese, enquanto o cálcio influencia a estrutura e a resistência da parede celular[32].

Outra dificuldade na produção do morango é a obtenção das mudas, que está diretamente relacionada com a produtividade e a qualidade da fruta produzida, pois representa o ponto de partida. Em sua maioria, as mudas produzidas no País não atingem o padrão de certificação. Consequentemente, mais de 80% das mudas utilizadas no Rio Grande do Sul são importadas do Chile e da Argentina[1].

O sistema de produção deve priorizar a utilização de métodos naturais, agrícolas, biológicos e biotecnológicos de controle de pragas e doenças, concomitantemente com a utilização de mudas sadias ou certificadas; emprego de técnicas adequadas como irrigação, adubação e manejo dos túneis; limpeza do entorno das áreas de produção e adoção de técnicas que conservam o solo[7]. Estas práticas reduzem a aplicação de agrotóxicos e, consequentemente, contribuem para preservação ambiental e segurança alimentar.

3 Resíduos de agrotóxicos

Na cultura do morango é grande a incidência de doenças e pragas que atingem as várias fases do ciclo da cultura, desde a muda recém-plantada até os frutos na fase final de produção. Para tentar contornar esses problemas e amenizar os prejuízos, utilizam-se agrotóxicos. Consequentemente, a cultura do morango necessita de um controle rigoroso que é realizado por meio do monitoramento de resíduos de agrotóxicos.

Os aspectos negativos da produção do morango podem ser verificados pelos dados e constatações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA),[33] através do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Baseado nos relatórios de atividades divulgados em dezembro de 2011, o morango, juntamente com o pimentão e o pepino, lidera o *ranking* dos alimentos mais contaminados com resíduos de agrotóxicos no Brasil. No caso do morango, o percentual de amostras irregulares foi de 63,4%, sendo que os problemas detectados nas análises dessas amostras foram os teores de resíduos de agrotóxicos acima do Limite Máximo de Resíduos (LMR) permitido e a detecção de agrotóxicos não autorizados para esta cultura. Esse fato na cultura do morango tem ocorrido desde 2002, e vem apresentando os resultados insatisfatórios mais elevados nas análises de resíduos de agrotóxicos na categoria de frutas.

3.1 Breve histórico dos agrotóxicos

Há mais de dois mil anos, os agricultores utilizavam substâncias que preveniam os danos causados por pragas, sendo uma das primeiras o enxofre. No século XV, utilizavam outras sustâncias tóxicas como arsênio, mercúrio e chumbo

e no século XVII começaram a empregar o sulfato de nicotina que era extraído das folhas de tabaco[34].

No Brasil, o uso de agrotóxicos industrializados já tem mais de meio século e uma das primeiras substâncias aplicadas nas lavouras foi o diclorodifeniltricloroetano (DDT).

Em 1985, a Portaria nº 329 de 2 de Setembro de 1985[35] proibiu, em todo o território nacional, a comercialização, o uso e a distribuição de produtos organoclorados destinados à agropecuária, exceto, para uso como iscas formicidas e de cupimicidas, combate a vetores de agentes etiológicos de moléstias, em uso emergencial na agricultura e na preservação de madeiras. O DDT, como todos os demais organoclorados, foi banido, tendo em vista seus efeitos nocivos baseados na neurotoxicidade, no aumento de câncer de mama em mulheres, em alterações causadas pelos efeitos estrogênicos, além dos problemas ambientais, como rápida absorção e bioconcentração nos organismos, redução da capacidade reprodutiva das aves e estabilidade alta à decomposição ou à degradação ambiental[36-38].

A busca por agrotóxicos menos persistentes no meio ambiente promoveu o uso dos organofosforados e carbamatos[37].

A classificação dos agrotóxicos constitui tema de controvérsia, pois várias denominações têm sido empregadas para designar sua ação ou organismo alvo (defensivos agrícolas, biocidas, pesticidas, praguicidas, produtos fitossanitários e agrotóxicos). No Brasil, a Lei Federal nº 7.802 de 11 de julho de 1989[39], conhecida como "Lei de Agrotóxicos", regulamentada pelo Decreto nº 4.074 de 4 de Janeiro de 2002[40], adota e define o termo "agrotóxico" para ser utilizado em todos os casos, substituindo os demais termos supracitados[38]. A Agência de Proteção Ambiental (EPA)[41] define o termo agrotóxico como sendo uma substância química ou mistura de substâncias utilizadas para prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga, ou mesmo, para regular, desfolhar e dessecar plantas.

Os agrotóxicos podem ser classificados quanto a: Finalidade (acaricida, aficida, formicida, fungicida, herbicida, inseticida, larvicida, ovicida, raticida, entre outros); Modo de Ação (ingestão, contato, microbiano e fumegante); Origem, provenientes de compostos orgânicos ou inorgânicos, de vegetais, bactérias ou fungos[38,42,43]. Os agrotóxicos inorgânicos foram muito utilizados no passado, porém, atualmente não representam mais que 10% do uso total, enquanto os agrotóxicos orgânicos constituem o maior grupo compreendendo os de origem vegetal e os organossintéticos[44].

Outra maneira de classificar os agrotóxicos é segundo as classes toxicológicas, em função da dose letal mediana (DL50)[45]. Dependendo da toxicidade do agrotóxico, a cor dos rótulos das embalagens ou as numerações podem variar: I = rótulo vermelho (extremamente tóxico); II = rótulo amarelo (altamente tóxico); III = rótulo azul (medianamente tóxico); e IV = rótulo verde (pouco tóxico)[7,46].

Outra classificação refere-se ao registro de propriedade industrial: produtos sob Proteção de Patentes ou Genéricos[47]. Segundo a Associação Brasileira dos Defensivos Genéricos (AENDA)[48], esse mercado representa mais de 70% em volume e 50% do valor negociado no mundo.

Os agrotóxicos somente podem ser utilizados no Brasil se estiverem registrados em um órgão federal competente. Segundo o Decreto nº 4.074 de 4 de janeiro de 2002[40], os três órgãos competentes para o registro de agrotóxicos são: Ministério da Saúde (MS), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Ministério do Meio Ambiente, através do IBAMA.

3.1.1 Produção econômica dos agrotóxicos

Segundo dados fornecidos pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produção para Defesa Agrícola (SINDAG)[49], no período de janeiro a julho de 2011, os inseticidas lideraram em crescimento em relação ao mesmo período em 2010, enquanto os herbicidas e fungicidas tiveram um decréscimo.

Tal crescimento leva à utilização de maiores quantidades de agrotóxicos, gerando preocupação com os alimentos consumidos em grande quantidade e *in natura*[34]. É importante destacar que menos de 0,1% dos agrotóxicos que são aplicados atingem o alvo, enquanto o restante pode alcançar outros ambientes, como as águas subterrâneas e superficiais, solo e ar[50].

Os dados disponibilizados pela Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades (ABIFINA) [51] mostram que o saldo comercial brasileiro entre 2005 e 2010 foi negativo, indicando que a importação de agrotóxicos superou a exportação. Porém, apesar deste cenário, o mercado de agrotóxicos teve um faturamento alto, perdendo apenas para o de medicamentos.

Estatísticas revelam que cada brasileiro consome em média 5,2 L de agrotóxicos por ano, e que, desde 2008, o Brasil tornou-se o maior consumidor mundial de agrotóxicos[52,53].

3.1.2 Legislação alimentar dos agrotóxicos

O estudo da avaliação dos riscos crônicos da ingestão de agrotóxicos é um processo no qual a exposição humana a um dado composto por meio de dieta é comparada a um parâmetro toxicologicamente seguro. Em geral, os governos conduzem estudos de avaliação de risco durante o processo de registro do agrotóxico e seus resultados podem influenciar no estabelecimento de LMR permitidos e restringir o uso em algumas culturas. No âmbito internacional, os estudos são conduzidos pela Reunião Conjunta de Peritos em Resíduos de Agrotóxicos da Organização para Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização Mundial de Saúde (OMS), e os resultados são posteriormente encaminhados ao Comitê do *Codex Alimentarius* para avaliação pelos Governos membros[43,54,55].

O LMR (Limite Máximo de Resíduos) é estabelecido pela legislação federal de cada país, e a Legislação Brasileira, por meio da Anvisa, define este limite como, a quantidade máxima de resíduos de agrotóxico legalmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo. O objetivo principal do LMR é garantir que a população, ao consumir diariamente produtos, cujos níveis de agrotóxicos estejam dentro dos limites estabelecidos, não deverá, segundo os conhecimentos científicos atuais, ter qualquer problema de saúde. A legislação também estabelece o intervalo de segurança de cada ingrediente ativo de agrotóxico para cada cultura agrícola[56].

O PARA foi iniciado em 2001 e é coordenado pela Anvisa, em conjunto com os órgãos de vigilância sanitária de 25 Estados participantes e do Distrito Federal. O objetivo é prevenir agravos à saúde da população pela exposição aos agrotóxicos através dos alimentos, implantando assim, em nível nacional, um serviço para monitorar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos que chegam à mesa do consumidor e adotar medidas de controle[57]. O PARA teve um crescimento ao longo dos anos, que pode ser verificado principalmente pelo número de culturas e agrotóxicos monitorados, respectivamente: 2007 (9 e 104), 2008 (17 e 167) e 2009 (20 e 234)[58].

Tabela 1 Porcentagem de amostras de morango insatisfatórias.

Ano	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
%	46,03	54,55	39,07	N	37,68	43,62	36,05	50,80	63,4

N: análises não realizadas. Os resultados referem-se aos Estados: AC, BA, DF, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SE, TO (entre os anos de 2002 a 2008); 25 estados e DF (2009 e 2010).

A Tabela 1[33,57,58] mostra a porcentagem de amostras de morango insatisfatórias entre 2002 e 2010. Esses resultados referem-se às amostras que apresentaram ingredientes ativos (IA) acima do LMR permitidos ou resíduos de IA não autorizados para a cultura. Através destes resultados observa-se que a utilização de agrotóxicos é muito intensa, caracterizando o índice crescente de irregularidades na produção do morango. Destaca-se que o maior consumo do fruto ocorre *in natura*, o que é um benefício para os consumidores, por ingerirem alimentos frescos, com todas as propriedades nutricionais e sem conservantes. Porém, o fruto pode conter resíduos de agrotóxicos em níveis elevados, principalmente se uma boa lavagem não tiver sido efetuada ou se o intervalo entre o tempo de aplicação do agrotóxico e de consumo for menor que o recomendado, trazendo malefícios aos consumidores.

Na última década, o estabelecimento e a regulamentação de LMR têm se tornado mais frequentes, porém existe uma grande dificuldade de harmonização com os valores estipulados pelo *Codex Alimentarius*. Estas discrepâncias estão relacionadas com vários fatores como, condições edafoclimáticas que são oriundas do meio ambiente e influenciam os solos; pragas presentes no ambiente; dose e forma de aplicação; intervalo de segurança proposto e diferenças nos períodos de colheita, comercialização ou consumo em que se avalia a quantidade de resíduo de agrotóxico[59].

3.1.3 Emprego de agrotóxicos na cultura do morango

Diversos fungos, bactérias e vírus atacam o morangueiro destruindo folhas, caules, frutos e raízes. As medidas gerais de controle das doenças são principalmente as preventivas e o uso de mudas sadias. As pragas que destroem o morangueiro são ácaros, insetos (broca-dos-frutos, grilos, pulgões, lagarta-rosca, etc.), nematoides, lesmas e caracóis[7].

Os ácaros são considerados as pragas primárias que causam os maiores danos e prejuízos à cultura do morangueiro, podendo reduzir a produção do morango em até 80%. O seu controle é difícil, pois as colheitas são realizadas diariamente e o fruto é consumido *in natura*, requerendo a aplicação de acaricidas que possuem um período curto de carência e baixa toxicidade[30,60].

Outro patógeno que prejudica o cultivo do morangueiro é o *Colletotrichum acutatum*, principal agente da antracnose no morangueiro, que se manifesta pela flor-preta, na qual ocorre a necrose progressiva dos pedúnculos e demais partes dos órgãos florais e culmina com a secagem e morte das flores. Essa é considerada a principal doença da cultura do morangueiro, podendo causar perdas que variam entre 30 e 68%[61,62]. Segundo Kososki et al.[63] aplicações de fungicidas, especialmente de procloráz, garantem maior produção de frutos e menor ocorrência da doença em flores. Entretanto, de modo geral, a incidência da doença em todos os tratamentos é muito alta, mostrando que o controle químico isoladamente pode não ser um método eficiente

para o manejo da flor-preta, apontando para a necessidade de investigação de outras estratégias de controle da antracnose.

Quando as medidas preventivas e biológicas de controle não são eficientes, recomenda-se a utilização do Controle Químico. Neste contexto, podem ser aplicados na cultura do morangueiro acaricidas registrados, observando-se as doses e os períodos de carência, e deve-se controlar primeiramente os focos de ácaros e, se necessário, toda a lavoura, além de variar os acaricidas com diferentes modos de ação[7].

3.2 Aspectos negativos dos agrotóxicos

O uso de agrotóxicos tem sido muito eficaz na redução de infestações de pragas e, consequentemente, para aumentar a produtividade agrícola e a qualidade do produto. No entanto, ao longo do tempo, as pragas alvo têm desenvolvido resistência aos agrotóxicos, acarretando o crescimento das suas populações, o que requer aumento na quantidade ou número de aplicações dos agrotóxicos[64]. Dessa forma, uma opção inicial considerada eficiente pode gerar problemas sérios no futuro.

Alguns agrotóxicos e seus metabólitos são considerados problemáticos por serem persistentes e bioacumulativos[65,66]. Segundo Schwarzenbach et al.,[67] a maioria dos agrotóxicos possuem alta hidrofobicidade e baixa reatividade no meio ambiente, que são as características responsáveis pela tendência em se acumularem ou bioconcentrarem nos tecidos dos organismos vivos.

3.2.1 Problemas sanitários dos trabalhadores rurais e segurança alimentar dos consumidores

A intoxicação por agrotóxicos é um problema de saúde pública grave, principalmente nos países em desenvolvimento e nos emergentes. Um dos fatores relacionados com a grande incidência de intoxicações por agrotóxicos é a facilidade de acesso e o número elevado de produtos formulados com essas substâncias, de uso tanto na agricultura como doméstico[68.69].

Os agrotóxicos são potencialmente tóxicos ao homem, podendo causar efeitos adversos ao sistema nervoso central e periférico, ter ação imunodepressora ou ser cancerígenos, mimetizadores de hormônios, entre outros[65,70]. A contaminação dos alimentos por resíduos de agrotóxicos pode vir de uma aplicação direta em uma das fases da produção da cultura, do transporte ou do armazenamento[71].

Outro fator preocupante é a contaminação ocupacional que pode ser imediata[34] e pode trazer comprometimentos à saúde que variam em função do estado nutricional, idade e sexo do indivíduo. Existem dois tipos principais de intoxicações por agrotóxicos: a Intoxicação Aguda, na qual os sintomas surgem rapidamente, de forma leve, moderada ou grave, dependendo do tempo de exposição e da toxicidade dos agrotóxicos, e é caracterizada por fraqueza, vômitos, convulsões, contrações musculares, dores de cabeça, dificuldade respiratória, sangramento nasal; e a Intoxicação Crônica, que surge tardiamente, em função de exposições repetidas e gera danos, na maioria das vezes, irreversíveis[38,72].

As principais fontes de intoxicações dos trabalhadores rurais são: falta do uso de vestimenta protetora; despreparo; falta de conhecimento dos perigos causados pelos agrotóxicos; ausência de recursos alternativos para o controle das pragas; indução ao uso excessivo, incentivado por vendedores e propagandas, com o intuito de garantir maior eficiência; condições precárias do trabalhador, como baixa escolaridade, [73] impedindo a leitura das recomendações que constam nas embalagens e falta de acesso às informações sobre os perigos gerados pelo contato com os agrotóxicos, moradias inadequadas, difícil

acesso ao tratamento de saúde[74] e proximidade das residências com o campo de aplicação dos agrotóxicos[70].

Frutas e vegetais com resíduos de agrotóxicos acima dos LMR causam grandes prejuízos aos produtores rurais, pois são proibidas de entrarem em mercados externos que possuem uma legislação controlada e rigorosa. Além das perdas econômicas, o fator mais preocupante está relacionado com a falta de segurança alimentar dos consumidores.

Devido às exigências cada vez mais rigorosas do comércio nacional e internacional em relação aos produtos agropecuários, a necessidade de implementação da PI tornou-se uma realidade. Este sistema emprega tecnologias que permitem o controle efetivo do sistema produtivo agropecuário, por meio do monitoramento de todas as etapas, desde a aquisição dos insumos até a oferta ao consumidor[75].

A adoção do sistema de PI evoluiu em curto espaço de tempo, sendo que, no Brasil, as atividades da Produção Integrada de Frutas (PIF) tiveram início entre 1998 e 1999. No estágio atual, o Sistema PIF já atingiu a consolidação em 18 culturas, sendo que o morango ingressou em 03/04/2008[76]. A Produção Integrada do Morango (PIMo) surgiu em função da conscientização dos produtores sobre a necessidade de se adaptarem aos novos princípios e se qualificarem, a fim de poderem competir no mercado internacional[24].

3.2.2 Impacto ambiental

Os agrotóxicos possuem vários caminhos que podem gerar rotas de contaminação no ar, solo, água e lençol freático. Os agrotóxicos, quando aplicados diretamente no solo, podem ser degradados por via química, fotólise ou micro-organismos, produzindo metabólitos ou compostos mais simples. Entretanto, as substâncias com alta persistência ou baixa taxa de degradação podem permanecer no ambiente sem sofrerem qualquer alteração e podem ser adsorvidas pelas plantas ou nas partículas do solo, e serem, posteriormente, dessorvidas e lixiviadas, pela presença das chuvas ou dos ventos. Os agrotóxicos podem ser transportados para regiões distantes das de aplicação, ou atingirem as águas superficiais ou percolarem para os lençóis subterrâneos. Nos ambientes aquáticos, os agrotóxicos podem sofrer adsorção ou dessorção nas partículas dos sedimentos, serem degradados por via química, biológica ou fotólise, ou serem volatilizados. Na atmosfera, o transporte depende das propriedades dos agrotóxicos (solubilidade, pressão de vapor, coeficiente de partição octanol/água, coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo, tempo de meia-vida, constante de ionização, entre outros); condições ambientais (clima, textura e conteúdo de água no solo); topografia e práticas de manejo (tipo de cultura e método de aplicação dos agrotóxicos)[42,50,77-80].

O comportamento de agrotóxicos no ambiente deve ser diferente em clima temperado e tropical. Alguns dados experimentais sugerem que as taxas de degradação devem ser mais altas em países tropicais devido às temperaturas e às radiações mais elevadas, que também causam aumento na toxicidade em função da maior volatilização[81].

Um fenômeno ecológico chamado de biomagnificação, no qual ocorre acumulação de agrotóxicos ao longo da cadeia alimentar, leva a um aumento da concentração de uma determinada substância com o aumento do nível trófico. Mesmo em concentrações baixas, os agrotóxicos representam riscos para algumas espécies de organismos aquáticos que podem concentrar estes produtos até 1000 vezes[82].

Dessa forma, os agricultores devem conservar os recursos naturais, para evitar a contaminação de seres humanos e vivos, e manter o equilíbrio ecológico através da redução de aplicação dos agrotóxicos nas culturas.

3.3 Produtos orgânicos no Brasil

A Agricultura Orgânica (AO) é um processo produtivo que emprega um mínimo de insumos externos, porém esta prática não garante a ausência total de resíduos, devido à existência de contaminação ambiental. Ela assegura o fornecimento de alimentos orgânicos saudáveis, mais saborosos e de maior durabilidade, pois apresentam maior resistência ao ataque de micro-organismos. Por não utilizar agrotóxicos e empregar sistema de manejo mínimo, preserva o meio ambiente e assegura a estrutura e fertilidade dos solos, evitando erosões e degradação, contribuindo assim para promover e restaurar a biodiversidade local. Por esse conjunto de fatores, a agricultura orgânica viabiliza a sustentabilidade da agricultura familiar e amplia a capacidade dos ecossistemas locais em prestar serviços ambientais a toda a comunidade do entorno, contribuindo para redução do aquecimento global[83,84]. Alguns procedimentos da AO são: uso da adubação verde ou orgânica; minhocultura; manejo da vegetação nativa, rotação de culturas, cultivos protegidos e uso racional da água de irrigação.

No Brasil, a AO possui sua legislação estabelecida pelo Decreto 6.323 de 27 de dezembro de 2007[85], que regulamenta a Lei nº 10.831 de 23 de dezembro de 2003[86]. Segundo esta legislação a AO engloba todas as diferentes correntes de agricultura alternativa ou sustentável ou ecológica. As primeiras correntes da AO foram: Agricultura Biodinâmica; Agricultura Orgânica; Agricultura Organobiológica e Agricultura Natural[87,88]. Aproximadamente 90% da produção orgânica nacional de banana, soja e café é exportada como matéria-prima, principalmente para os Estados Unidos, União Europeia e Japão. O Brasil também se destaca na exportação de suco de laranja e açúcar orgânico[87].

Krolow et al.[89] avaliaram os aspectos físicos e químicos do morango cv. cultivado de maneira orgânica e convencional. Os resultados mostraram que os morangos cultivados pelo sistema de AO apresentaram maiores diferenças percentuais para os teores de antocianinas, sólidos solúveis totais e razão de sólidos solúveis totais/acidez total titulável (SST/ATT), que foram de 106,1, 16,1 e 24,3%, respectivamente, e superiores ao sistema convencional. O principal aspecto negativo da AO foi à redução de 8,4% no teor de ácido ascórbico em relação ao convencional. Porém, é importante destacar que não somente o sistema de produção influencia nestes índices, mas o ponto de maturação em que a fruta é colhida, haja vista que os produtores tendem a colhê-las um pouco verdes para que resistam até o momento de comercialização.

A procura por alimentos orgânicos é crescente devido aos benefícios já citados, contudo, um dos entraves à expansão deste segmento é o preço que é superior aos dos produtos de cultivo convencional[90,91].

4 Métodos analíticos de preparo de amostra e de determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de morango

4.1 Técnicas de preparo de amostras para extração de resíduos de agrotóxicos

A determinação de um analito numa amostra é caracterizada por três etapas principais: 1) amostragem, que deve ser representativa de um todo; 2) preparo de amostra, destinada a

extrair, isolar e/ou concentrar o analito e/ou eliminar os interferentes; 3) análise da amostra, separação, identificação e quantificação dos analitos, e, caso necessário, confirmação do resultado para uma análise mais segura[92,93].

Dentre as etapas analíticas empregadas na determinação de multirresíduos de agrotóxicos, a extração dos analitos é considerada uma das mais críticas e importantes, uma vez que engloba procedimentos laboriosos que demandam tempo, custo elevado e geram grandes quantidades de resíduos tóxicos[94-97]. Outras adversidades a serem superadas nesta etapa é a extração simultânea de compostos com propriedades físico-químicas diferentes, em baixa concentração e em diferentes matrizes.

A análise de resíduos de agrotóxicos teve início na década de 60, com determinações de organoclorados; na década de 70 foram introduzidas mudanças para ampliar o intervalo de polaridade dos compostos analisados, que se estenderam para os organofosforados e nitrogenados; e nas décadas posteriores, começaram a surgir preocupações com a utilização dos solventes clorados e com a quantidade de resíduos gerados na etapa de extração, exigindo mudanças nas técnicas de preparo de amostra[97-99].

Numerosas técnicas de extração de agrotóxicos em frutas e vegetais, principalmente em morangos, com determinação por cromatografia líquida (CL) ou gasosa (CG) têm sido empregadas. Entre estas técnicas pode-se destacar: o particionamento de solventes (extração líquido-líquido), extração sólido-líquido (*Solid Liquid Extration* - SLE)[96,100-103], extração assistida por micro-ondas (*Microwave Assisted Extraction* - MAE)[104-106], extração em fase sólida (*Solid-Phase Extraction* - SPE)[106-111], microextração em fase sólida (*Solid-Phase Microextraction* - SPME)[104,112-114], dispersão da matriz em fase sólida (*Matrix Solid-Phase Dispersion* - MSPD)[103,115,116], extração líquida pressurizada (*Pressurized Liquid Extraction* - PLE)[117-119], e extração sortiva em barras de agitação (*Stir Bar Sorptive Extraction* - SBSE)[120,121].

Existem várias técnicas de preparo de amostras para alimentos, porém os parâmetros principais que um analista deve levar em consideração para optar por uma técnica de extração são: número e classe de agrotóxicos, limite de quantificação, tipo de amostra e teor de gordura[122]. Os métodos de preparo de amostras apresentam vantagens e desvantagens que vão depender: do volume de solvente, extração de coextrativos, uso de solventes não clorados, quantidade de amostra, extração específica ou seletiva, manual ou automatizada, *on-line* ou *off-line,* facilidade de acoplamento para determinação por CL ou CG, entre outras.

Em 2003, Anastassiades et al.[99] com o objetivo de superar as limitações práticas dos métodos de extração de multirresíduos de agrotóxicos, introduziram o método *QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)*, no qual o processo de extração consiste de duas etapas: extração por solvente orgânico, com adição de sais para efeito *salting out* e secante, e *clean–up* dispersivo. Esse método tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto, seguro e compatível com CG e CL[123-125].

Dependendo das características físico–químicas dos analitos e da matriz, podem ser introduzidas modificações no método *QuEChERS* Original (2003), como mudanças de pH pela adição de diferentes tipos de tampão, emprego de diferentes solventes orgânicos, acetonitrila, acetato de etila e acetona, e utilização de diversos tipos de sorventes na etapa de *clean-up*.

Dois métodos *QuEChERS* modificados[126,127], um empregando tampão acetato e o outro tampão citrato, foram adotados, respectivamente, pela *AOAC Official Method* (2007)

e pela *European Committee for Standardization (CEN) Standard Method* EN 15662 (2008). A escolha do método *QuEChERS* depende do tipo de amostra e das características dos agrotóxicos, e visa obter recuperações elevadas e solucionar o problema da instabilidade dos compostos em determinados pH[128].

Ao contrário do *clean-up* em SPE que utiliza cartucho, coluna ou disco[129], no método *QuEChERS* a extração em fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid-Phase Extraction*, d-SPE) permite que o *clean-up* de interferentes e a redução de água residual sejam efetuados de forma rápida e simultânea. Esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, o que facilita a precipitação de coextrativos ou interferentes polares e permite a injeção direta do extrato final nos equipamentos de CG ou CL[95,130]. Dependendo da composição da amostra, pode-se optar por sorventes com características diferentes ou misturas desses, como amina primária secundária (*Primary Secondary Amine* - PSA) ou propiletilenodiamina, carbono grafinitizado (*Grafitized Carbon Black* - GCB), octadecilsiloxano (C18), entre outros. Para amostras de morango, o sorvente mais recomendando é o PSA, que possui uma estrutura bidentada com efeito quelante elevado, que promove a remoção de açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos e pigmentos como antocianinas.

Atualmente, o método *QuEChERS* está sendo muito utilizado nas determinações de multirresíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos, devido a uma série de vantagens, entre elas: porcentagens altas de recuperação dos agrotóxicos com diferentes propriedades físico-químicas; não utilização de solventes clorados, contribuindo para a química verde; baixo custo e manipulação fácil. Porém, o fator de concentração que pode ser alcançado é menor quando comparado ao que pode ser obtido empregando a SPE. Em vista disso, esse é um parâmetro importante que deve ser considerado, pois, dependendo do tipo de detector a ser utilizado, os LMR estabelecidos podem não ser atingidos.

4.2 Determinação de resíduos de agrotóxicos e componentes em morango com destaque para cromatografia líquida moderna

Inicialmente os resíduos de agrotóxicos eram analisados por métodos colorimétricos e cromatográficos não muito sofisticados, sendo que determinavam poucos analitos em alguns tipos de amostras[37]. Atualmente, o monitoramento de resíduos de agrotóxicos é realizado para várias classes simultaneamente, por meio de uma extração associada a uma técnica analítica instrumental, sendo a CL e CG as técnicas mais utilizadas[131-134].

A CLAE passou a ter seu uso intensificado em várias áreas e na década de 70, *Snyder* propôs uma denominação mais abrangente para a técnica, *Modern Liquid Chromatography*. Este nome descreve a técnica instrumental desenvolvida em contraposição à CL clássica, não tendo sentido temporal, ou seja, moderna por ser contemporânea[135,136]. Atualmente, devido à grande expansão da CL moderna, em contraste ao uso reduzido da CL clássica, muitas vezes, emprega-se somente a denominação de cromatografia líquida (CL).

As principais vantagens da CL incluem a capacidade de realizar separações e determinações qualitativas e quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, independente da volatilidade, estabilidade térmica e polaridade, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e repetibilidade[137,138].

A cromatografia gasosa é uma técnica com um poder de resolução excelente, o que facilita a análise de diversos analitos numa mesma amostra[139]. Entretanto, a polaridade e instabilidade

térmica de alguns agrotóxicos, tornam as análises por CG mais difíceis[140], fazendo-se necessária uma etapa de derivatização, o que pode aumentar o tempo e o custo da análise.

As determinações por CL podem ser realizadas empregando-se vários tipos de detectores, sendo os mais utilizados o arranjo de diodos (DAD) e o espectrômetro de massas (EM), que realizam análises qualitativas e/ou quantitativas.

No cenário atual, a CL acoplada à espectrometria de massas tem-se mostrado uma das técnicas mais poderosas para a determinação de resíduos de agrotóxicos[141]. O destaque da CL se deve à tendência ao emprego de agrotóxicos mais polares, por serem menos persistentes e tóxicos que os apolares. O acoplamento das duas técnicas combina as vantagens de ambas, a alta seletividade e a eficiência de separação da CL e a informação estrutural, a massa molar e a melhora na seletividade e detectabilidade da espectrometria de massas[136,142-145].

A espectrometria de massas sequencial (em série ou *Tandem*) está sendo cada vez mais utilizada na área química, principalmente em análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Esse modo tem sido considerado uma ferramenta de identificação e confirmação, no qual o monitoramento dos fragmentos fornece maior discriminação que um único estágio, reduzindo a necessidade de etapas excessivas de preparo de amostra; diminui resultados falsos positivos, especialmente em amostras complexas, como frutas e vegetais; permite a identificação de analitos a níveis de ultratraços (ng ou menor) e com características físico-químicas diferentes; resulta em menor tempo e custo das análises, com maior detectabilidade e seletividade[102,146-148]. O aumento da seletividade do detector reduz a influência do efeito matriz e aumenta a detectabilidade, uma vez que aumenta a razão sinal/ruído (*Signal to Noise* – S/N), e consequentemente, permite que os LMR sejam atingidos com maior facilidade[132,142].

O desenvolvimento de novos métodos ou modificações dos já existentes requer uma etapa de validação. Um guia de validação muito importante para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos é o Sanco *(Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food And Feed*)[149] que é direcionado às aplicações que envolvem determinações por CL e CG acopladas a EM.

Alguns trabalhos que ilustram o desenvolvimento e a validação de métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos e de componentes do morango, empregando as técnicas citadas, serão apresentados.

Soler et al.[103] compararam duas técnicas de extração: MSPD, utilizando C18 como dispersante, diclorometano e metanol como eluente, e SLE com solvente acetato de etila, na determinação de nove agrotóxicos (acrinatrina, carbosulfano, ciproconazol, γ-cialotrina, cresoxim metilíco, pirifenox, piriproxifem, propanil, e tebufempirado) em amostras de laranja e morango, empregando CL-EM/EM. Recuperações na faixa de (51,5-108)% e de (59-101)% e estimativas de desvio padrão relativo de <16% e <17%, foram obtidas para MSPD e SLE, respectivamente. Contudo, para a maioria dos agrotóxicos, os limites de quantificação (LQ) foram melhores para SLE (0,01-0,4) mg kg^{-1} que para MSPD (0,05-2) mg kg^{-1}. Os autores concluíram que a SLE permitiu melhor detectabilidade que a MSPD, devido aos valores dos LQ, porém a MSPD tem a vantagem de utilizar menor volume de solvente.

Um trabalho que é considerado ambientalmente correto, por utilizar água como solvente de extração, foi desenvolvido por Falqui-Cao et al.[104]. Os autores empregaram

duas técnicas de extração, assistidas por micro-ondas focalizada (*Focused Microwave-Assisted Extraction* - FMAE) e SPME acoplada com CLAE-DAD para determinação de cinco agrotóxicos (azoxistrobina, bupirimato, carbendazim, dietofencarb, napropamida) em amostras de morangos. As amostras foram extraídas com água por FMAE e o extrato aquoso foi exposto a uma fibra de poli(dimetilsiloxano)/divinilbenzeno (PDMS/DVB) na SPME. Os agrotóxicos foram dessorvidos na interface SPME/CLAE para sua quantificação, com limites de detecção inferiores a μg kg^{-1} (ppb), que estão abaixo dos LMR.

Em um trabalho desenvolvido por Soler et al.[119], empregaram-se três tipos de analisadores de massas: Triplo Quadrupolo (QqQ), Quadrupolo Armadilha de Íons (*Ion Trap* - QIT) e Quadrupolo por Tempo por Voo (*Quadrupole-Time-of-Flight* - QqTOF) na determinação de doze de agrotóxicos (acrinatrina, bupirimato, buprofezina, ciproconazol, γ-cialotrina, fluvalinato, hexaflumurom, cresoxim metilíco, propanil, pirifenox, piriproxifem e tebufenpirado), em seis matrizes (cereja, damasco, laranja, morango, pera e pêssego) e extração por PLE. As estimativas do desvio padrão relativo foram menores para QqQ (5-12)%, em comparação ao QIT (6-15)% e QqTOF (14-19)%. A faixa linear dinâmica foi pelo menos de três ordens de grandeza maior para o QqQ, enquanto para QIT e QqTOF foram de duas e uma ordem, respectivamente. O QqQ foi pelo menos 20 vezes mais sensível que QIT e QqTOF. Contudo, o QqQ não foi adequado para identificação do etirimol que é o metabólito do bupirimato. Portanto, verifica-se que o analisador ideal depende do tipo específico de análise, que pode ser qualitativa ou quantitativa.

A hifenação de diferentes técnicas de extração pode ser uma alternativa interessante para análises de resíduos de agrotóxicos. Um método desenvolvido por *Urruty* e *Montory*[150] utilizou MAE e SPME acopladas à CG-EM ou CLAE-DAD para análise de vinte agrotóxicos em morangos. Os resultados mostraram que o método desenvolvido foi simples, rápido, ambientalmente correto e de baixo custo.

Sagratini et al.[151] analisaram agrotóxicos das classes carbamato e fenilureia em sucos de frutas (cereja, laranja, maçã e morango), empregando SPME acoplada à CL/EM e CL/QIT- EM. Os agrotóxicos foram extraídos com três fibras diferentes, Carbowax/resina template (CW/TPR) de 50 μm, poli(dimetilsiloxano)/divinilbenzeno (PDMS/DVB) de 60 μm e poliacrilato de 85 μm, sendo que as duas primeiras fibras forneceram melhores recuperações. Os autores verificaram que tanto o monitoramento SIM (*Selected Ion Monitoring*) como o MRM (*Multiple Reaction Monitoring)* forneceram resultados adequados, porém o MRM mostrou maior detectabilidade.

Existe uma diversidade de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos em morangos por CL, com diferentes justificativas para o seu uso, porém deve-se priorizar um método abrangente, rápido, confiável, de custo baixo, ambientalmente correto e que seja capaz de analisar diversas classes de agrotóxicos com alta detectabilidade.

A CL é muito útil para determinações de agrotóxicos e também de componentes no morango, responsáveis pelos atributos sensoriais como sabor, aparência e textura. Esses componentes podem diferir em quantidades, pois dependem do tipo de cultivar, e das condições climáticas nas quais o morango foi cultivado[20]. Outro fator importante, como taxa de amadurecimento, também influencia nas características do morango.

Montero et al.[152] estudaram a taxa de açúcares, ácidos, compostos fenólicos, substâncias pécticas na cultivar *Chandler* e determinaram

o período ótimo de frutificação, de 28-35 dias, sendo que o 28º dia corresponde ao melhor estágio de desenvolvimento (peso maior) e amadurecimento (maior razão açúcar:ácido) com coloração e textura apropriadas para o consumo. Esse estudo foi realizado empregando CLAE-DAD e CLAE com detector por Índice de Refração (IR).

Entre os diferentes compostos presentes no morango, os ácidos orgânicos, vitamina C, carboidratos e antocianinas são os mais frequentemente analisados, devido as suas contribuições para as propriedades sensoriais e nutricionais. Mangas et al.[153] determinaram açúcares (frutose, glucose e sucrose), ácidos orgânicos (málico, químico, cítrico e fumárico) e vitamina C em morangos, sendo que, entre os açúcares, a frutose foi encontrada em maior abundância e, entre os ácidos, o cítrico e málico foram encontrados em maior quantidade. Os compostos foram analisados por CLAE em fase reversa (FR) com detector UV-Vis ou por troca catiônica com detector por IR.

Herrera e Castro[154] desenvolveram um método semiautomático para determinação de compostos fenólicos (catequina, naringina, rutina, naringenina, ácido elágico, quercetina e kaempferol) em amostras de morango, usando a extração assistida por ultrassom e determinação por CLAE-DAD. Silva et al.[155] também realizaram um estudo sobre a determinação de 25 pigmentos de antocianinas, que são compostos fenólicos, em cinco cultivares de morango, por CLAE com detecção dupla *on-line*, DAD e EM. A concentração de antocianinas variou de 200-600 mg kg^{-1}, sendo a forma predominante a pelargonidina 3-glucosídeo, seguida de pelargonidina 3-rutinosídeo e cianidina 3-glucosídeo, numa soma total de mais de 95% de antocianinas em morango. Foi encontrada uma variabilidade marcante entre as concentrações de antocianina em amostras de uma mesma espécie e colheita, indicando uma forte influência do grau de maturidade, fatores climáticos e edáficos e armazenamento pós-colheita.

É importante notar que, os componentes do morango são dependentes das condições ambientais como também do tipo de cultivar estudado. Portanto, deve-se sempre descrever detalhamente as condições que foram utilizadas na produção agrícola do morango para efeitos comparativos, garantindo maior confiabilidade dos resultados.

5 Considerações finais

O crescimento da população mundial demanda maior produção de alimentos, o que tem provocado aumento na utilização de agrotóxicos na produção agrícola. Como consequência, resíduos tóxicos destes compostos podem contaminar o meio ambiente, as frutas e os vegetais que são consumidos por crianças, adultos e idosos.

Existem várias fontes que induzem o monitoramento de resíduos de agrotóxicos como o comércio exterior, ou seja, a exportação de alimentos, pois uma concentração acima dos limites internacionalmente aceitos pode causar a devolução dos alimentos ou abalar a relação exportação/importação entre diferentes países. Outra contribuição de grande importância é a preocupação e a conscientização cada vez maior dos órgãos de pesquisa e dos consumidores acerca dos malefícios decorrentes do contato e da ingestão dessas substâncias tóxicas, requerendo maiores informações sobre o produto a ser consumido.

Infelizmente, não há variedades de morango totalmente resistentes a pragas e doenças, e o controle químico, embora seja uma solução, com o decorrer do tempo, os micro-organismos podem

adquirir resistência aos agrotóxicos, requerendo a aplicação de uma dose maior. Por isso, os produtores de morango devem fazer uso dos procedimentos das BPA, empregando agrotóxicos seletivos, observarem o período de carência, a dosagem correta, a segurança dos trabalhadores rurais, recorrerem a métodos alternativos de controle como uma opção auxiliar, utilizarem mudas de morangos certificadas, cultivarem o morango em ambientes protegidos e em condições controladas, sempre que possível optarem pela produção orgânica, com maior área de cultivo, e diminuírem o custo da produção, para atenderem uma parcela maior de consumidores e contribuírem com menor liberação de resíduos. A alternativa para diminuir os riscos dos agrotóxicos é uma maior fiscalização sobre as vendas, usos de agrotóxicos e o destino das embalagens vazias que devem ser lavadas e armazenadas em locais apropriados.

Finalmente, deve-se tentar unir uma produção agrícola mais adequada com o monitoramento rigoroso de resíduos de agrotóxicos nos alimentos, para minimizar os impactos ambientais e a contaminação dos alimentos; garantir a segurança dos trabalhadores rurais e fornecer alimentos mais saudáveis para os consumidores.

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos deve basear-se em uma técnica de preparo de amostra rápida, econômica, ambientalmente correta e segura como o método *QuEChERS*, e em uma técnica de separação rápida e eficiente como a CL acoplada a um detector de alta detectabilidade e seletividade como o espectrômetro de massas, que hoje se constitui em uma das ferramentas mais poderosas de detecção analítica.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP, ao CNPq e à CAPES o apoio financeiro e à Dra. Liane Maldaner sua valiosa colaboração na revisão final.

Referências

1 Oliveira RP, Scivittaro WB. Desempenho produtivo de mudas nacionais e importadas de morangueiro. *Revista Brasileira de Fruticultura* 2006; 28(3):520. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452006000300040

2 Françoso ILT, Couto MAL, Canniatti-Brazaca SG, Arthur V. Alterações físico-químicas em morangos (Fragaria anassa Duch.) irradiados e armazenados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2008; 28(3):614. http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000300017

3 Camargo Filho WP, Camargo FP. Análise da produção de morango dos Estados de São Paulo e Minas Gerais e do mercado da CEAGESP. *Informações Econômicas* 2009; 39(5):42-50.

4 Figueiredo FC, Botrel PP, Teixeira CP, Petrazzini LL, Locarno M, Carvalho JG. Pulverização foliar e fertirrigação com silício nos atributos físico-químicos de qualidade e índices de coloração do morango. *Ciência e Agrotecnologia* 2010; 34(5):1306. http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542010000500032

5 Giménez G, Andriolo J, Godoi R. Cultivo sem solo do morangueiro. *Ciência Rural* 2008; 38(1):273-279. http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000100048

6 Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças. *Tabela de composição nutricional das hortaliças* [cited 2011 nov.]. Available from: http://www.cnph.embrapa.br/util/tabelahortalicas.htm.

7 Embrapa. Embrapa Clima Temperado. *Sistema de produção do morango* [cited 2011 nov.]. Available from: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br.

8 Bordignon Junior CL, Francescatto V, Nienow AA, Calvete E, Reginatto FH. Influence of the extraction solution pH on the content of anthocyanins in strawberry fruits. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2009; 29(1):183-188. http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000100028

9 Hakkinen SH, Torronen AR. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International* 2000; 33:517-524. http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00086-7

10 Seeram NP, Lee R, Scheuller S, Heber D. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chemistry* 2006; 97(1):1-11. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.047

11 Rocha DA, Abreu CMP, Corrêa AD, Santos CD, Fonseca EWN. Análise comparativa de nutrientes funcionais em morangos de diferentes cultivares da região de Lavras-MG. *Revista Brasileira de Fruticultura* 2008; 30(4):1124-1128. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452008000400046

12 Henrique CM, Cereda MP. Utilização de biofilmes na conservação pós-colheita de morango (Fragaria Ananassa Duch) cv IAC Campinas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 1999; 19(2):1. http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611999000200014

13 Ponce AR, Bastiani MID, Minim VP, Vanetti MCD. Características físico-químicas e microbiológicas de morango minimamente processado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. No prelo.

14 Moraes IVM, Cenci AS, Benedetti BC, Mamede AMGN, Soares AG, Barboza HTG. Características físicas e químicas de morango processado minimamente e conservado sob refrigeração e atmosfera controlada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2008: 28(2):274. http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000200003

15 Siqueira HH, Boas BMV, Silva JD, Nunes EE, Lima LCO, Santana MTA. Armazenamento de morango sob atmosfera modificada e refrigeração. *Ciência e Agrotecnologia* 2009; 33:1712-1715.

16 Cenci SA, Gomes CAO, Alvarenga ALB, Freire Juinior M. Boas práticas de processamento mínimo de vegetais na agricultura familiar. In: Nascimento Neto F, organizador. *Recomendações básicas para a aplicação das boas práticas agropecuárias e de fabricação na agricultura familiar* [cited 2011 oct.]. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; 2006. p.@#@59-63. Available from: http://www.ceasa.gov.br/dados/publicacao/pub10.pdf.

17 Reis KC, Siqueira HH, Alves AP, Silva JD, Lima LCO. Efeito de diferentes sanificantes sobre a qualidade de morango cv. Oso Grande. *Ciência e Agrotecnologia* 2008; 32(1):196-202. http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542008000100029

18 Andriguet JR, Kososk AR. *Desenvolvimento e conquistas da produção integrada de frutas no Brasil* [cited 2011 sept.]. Brasília: Secretaria de Comércio Exterior; 2005. Available from: http://www.cnpuv.embrapa.br/tecnologias/pin/pdf/p_01.pdf.

19 Ciscato CHP, Gebara AB, Monteiro SH. Pesticide residue monitoring of Brazilian fruit for export 2006–2007. *Food Additives and Contaminants*: Part B 2009; 2(2):140-145.

20 Resende JTV, Camargo LKP, Argandoña EJS, Marchese A, Camargo CK. Análise sensorial e caracterização química de frutos de morango. *Horticultura Brasileira* 2008; 26(3):371. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362008000300015

21 Otto RF, Morakami RK, Reghin MY, Caíres EF. Cultivares de morango de dia neutro: produção em função de doses de nitrogênio durante o verão. *Horticultura Brasileira* 2009; 27(2):217. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362009000200017

22 Oliveira RP, Scivittaro WB. Produção de frutos de morango em função de diferentes períodos de vernalização das mudas. *Horticultura Brasileira* 2009; 27(1):91-95. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362009000100018

23 Oliveira RP, Scivittaro WB. Produção de morangueiro cv. "Cegnidarem" sob túnel plástico. *Ciência Rural* 2008; 38(9):2613-2617. http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008005000033

24 Madail JCM, Antunes LEC, Reisser Junior C, Belarmino LC, Neutzling DM, Silva BA. Economia da produção de morango: estudo de caso de transição para produção integrada. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 2007; 53:1-25.

25 Henz GP. Desafios enfrentados por agricultores familiares na produção de morango no Distrito Federal. *Horticultura Brasileira* 2010; 28(3):260-265. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362010000300003

26 Tessarioli Neto J, Ortigoza LER, Verdial MF. Produção de mudas de cultivares de morangueiro em duas épocas de coleta. *Horticultura Brasileira*. 2003; 21(2):231-233. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362003000200022

27 Resende JTV, Morales RGF, Faria MV, Rissinin ALL, Camargo LKP, Camargo CK. Produtividade e teor de sólidos solúveis de frutos de cultivares de morangueiro em ambiente protegido. *Horticultura Brasileira* 2010; 28(2):185. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362010000200008

28 Villela Júnior LVE, Araújo JAC, Factor TL. Análise do resfriamento da solução nutritiva para cultivo hidropônico do morangueiro. *Engenharia Agrícola*

2004; 24(2):338. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-69162004000200012

29 Verdial MF, Minami JTNK, Scarpare Filho JA, Christoffoleti PJ, Scarpare FV, Barela JF et al. Vernalização em cinco cultivares de morangueiro. *Ciência Rural* 2007; 37(4):976. http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782007000400009

30 Fadini MAM, Pallini A, Venzon M. Controle de ácaros em sistema de produção integrada de morango. *Ciência Rural* 2004; 34(4):1271. http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782004000400053

31 Durner EF, Poling EB, Maas JL. Recent advances in strawberry plug transplant technology. *HortTechnology* 2002; 12(4):545-550.

32 Andriolo JL, Jänisch DI, Schmitt OJ, Dal Picio M, Cardoso FL, Erpen L. Doses de potássio e cálcio no crescimento da planta, na produção e na qualidade de frutas do morangueiro em cultivo sem solo. *Ciência Rural* 2010; 40(2):267. http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010000200003

33 Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA. *Minuta de nota técnica para divulgação de relatório de atividades de 2010*. Brasília: ANVISA; 2011.

34 Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. *Revista Saúde Pública* 2006; 40(2):361. http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102006000200028

35 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 329, de 02 de setembro de 1985. Proibe em todo o território nacional, a comercialização, o uso e a distribuição dos produtos agrotóxicos organoclorados que especifica [cited 2011 sept.]. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 1985 set. Available from: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/329_85.htm.

36 D'Amato C, Torres JPM, Malm O. DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): Toxicidade E Contaminação Ambiental - uma revisão. *Química Nova* 2002; 25(6):995. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000600017

37 Stoppelli IMBS, Magalhães CP. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva* 2005; 10(91):91-100. http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232005000500012

38 Jardim ICSF, Andrade JA, Queiroz SCN. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - um enfoque às maçãs. *Química. Nova* 2009; 32(4):996. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000400031

39 Brasil. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, experimentação, produção, embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências [cited 2011 sept.]. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 1989 jul. 12. Available from: http://www.planalto.gov.br/CCIVIL_03/LEIS/L7802.htm.

40 Brasil. Presidência da República, Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências [cited 2011 sept.]. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 2002 jan. Available from: http://www.planalto.gov.br/CCIVIL_03/decreto/2002/D4074.htm.

41 United States Environmental Protection Agency - EPA. *About pesticides* [cited 2011 sept.]. Available from: http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm.

42 Sanches SM, Silva CHTP, Campos SX, Vieira EM. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. *Pesticidas*: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente 2003; 13:53-58.

43 Ribeiro ML, Lourencetti C, Polese L, Navickiene S, Oliveira LC. Pesticidas: Usos e riscos para o meio ambiente. *Holos Environment* 2008; 8(1):53-71.

44 Planeta Orgânico. *Agrotóxicos* [cited 2011 oct.]. Available from: http://www.planetaorganico.com.br/agrothist1.htm.

45 São Paulo (Estado). Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo. Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN. *Toxicologia de Praguicidas* [cited 2011 sept.]. Available from: http://www.sucen.sp.gov.br/downl/segtrb/sequi5.pdf.

46 Faria NMX, Fassa AG, Facchini LA. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. *Ciência & Saúde Coletiva* 2007; 12(1):25-38. http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232007000100008

47 Velasco LOM, Capanema LXL. O setor de agroquímicos. *BNDES Setorial* 2006; 24:69-96.

48 Associação Brasileira dos Defensivos Genéricos - AENDA. *Genéricos* [cited 2011 sept.]. Available from: http://aenda.org.br.

49 Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola - SINDAG. *Dados de Mercado* [cited 2011 sept.]. 2011. Available from: http://www.sindag.com.br.

50 Sabik H, Jeannot R, Rondeau B. Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. *Journal of Chromatography A* 2000; 885: 217-236. http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01084-5

51 Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades - Abifina. *Saldo Comercial* [cited 2011 sept.]. Available from: http://www.abifina.org.br/saldocom.asp.

52 Instituto Salus. *Uso de agrotóxicos no Brasil lidera ranking mundial* [cited 2011 nov.]. Available from: http://www.institutosalus.com/noticias/saude-publica/uso-de-agrotoxicos-no-brasil-lidera-ranking-mundial.

53 Agrosoft Brasil. Brasil, maior consumidor de agrotóxicos do mundo [cited 2011 sept.]. *Jornal Agrosoft*, 2011. Available from: http://www.agrosoft.org.br/agropag/218371.htm.

54 Caldas ED, Souza LCKR. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. *Revista de Saúde Pública* 2000; 34(5):529-537. http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102000000500014

55 Codex Alimentarius Commission. *Codex pesticides residues in food online database* [cited 2011 oct.]. Available from: http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/index.html.

56 Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Consulta Pública nº 43, de 2 de junho de 2005. [cited 2011 sept.]. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 2005 jun. 6. Available from: http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B10559-1-0%5D.PDF.

57 Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA. *Minuta de nota técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008*. Brasília: ANVISA; 2009.

58 Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA. *Minuta de nota técnica para divulgação de relatório de atividades de 2009*. Brasília: ANVISA; 2010.

59 Fermam RKS, Antunes AMS. Uso de defensivos agrícolas, limites máximos de resíduos e impacto no comércio internacional: Estudo de caso. *Revista de Economia e Agronegócio* 2009; 7(2):197-214.

60 Ferla NJ, Marchetti MM, Gonçalves D. Ácaros predadores (Acari) associados à cultura do morango (Fragaria sp., Rosaceae) e plantas próximas no Estado do Rio Grande do Sul. *Biota Neotropica* 2007; 7(2):1. http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032007000200012

61 Domingues RJ, Töfoli JG, Oliveira SHF, Garcia Júnior O. Controle químico da Flor Preta (*Colletotrichum Acutatum Simmonds*) do morangueiro em condições de campo. *Arquivos do Instituto Biológico* 2001; 68(2):37-42.

62 Ueno B. Antracnose do morangueiro ("Flor Preta") causada por *Colletotrichum acutatum*. *Instituto Agronômico do Paraná* 1996; ano IX, 119:1-11.

63 Kososki RM, Furlanetto C, Tomita CK, Café Filho AC. Efeito de fungicidas em *Colletotrichum Acutatum* e controle da Antracnose do Morangueiro. *Fitopatologia Brasileira* 2001; 26(3):662. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582001000300016

64 Clevo W, Clem T. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. *Ecological Economics* 2001; 39: 449-462. http://dx.doi.org/10.1016/S0921-8009(01)00238-5

65 Lintelmann J, Katayama A, Kurihara N, Shore L, Wenzel A. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 2003; 75(5):631-681. http://dx.doi.org/10.1351/pac200375050631

66 McKinlay R, Plant JA, Bell JNB, Voulvoulis, N. Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment. *Environment International* 2008; 34:168-183. PMid:17881056. http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2007.07.013

67 Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM. *Environmental Organic Chemistry*. 2rd@#@ed. Wiley-Interscience; 1995.

68 Rebelo FM, Caldas ED, Heliodoro VO, Rebelo RM. Intoxicação por agrotóxicos no Distrito Federal, Brasil, de 2004 a 2007 - análise da notificação ao Centro de Informação e Assistência Toxicológica. *Ciência & Saúde Coletiva* 2011, 16(8):3493-3502. http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232011000900017

69 Bochner R. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas SINITOX e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva* 2007; 12(1):73-89. http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232007000100012

70 Ward MH, Nuckols JR, Weigel SJ, Maxwell SK, Cantor KP, Miller RS. Identifying populations potentially exposed to agricultural pesticides using remote sensing and a geographic information system. *Environmental Health Perspectives* 2000; 108(1):5-12. PMid:10622770. PMCid:1637858. http://dx.doi.org/10.2307/3454289

71 Araújo ACP, Nogueira DP, Augusto LGS. Impacto dos praguicidas na saúde: estudo da cultura de tomate *Revista de Saúde Pública* 2000; 34(3):309-313. http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102000000300016

72 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Departamento de ações programáticas estratégicas. Área técnica de saúde do trabalhador. Diretrizes para atenção integral à saúde do trabalhador de complexidade diferenciada. *Protocolo de atenção à saúde dos trabalhadores expostos a agrotóxicos* [cited 2011 aug.]. Brasília; 2006. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/integra_agrotoxicos.pdf.

73 Silva JJO, Alves SR, Meyer A, Perez F, Sarcinelli PN, Mattos RCOC et al. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 2001; 35(2):130-135. PMid:11359198. http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102001000200005

74 Kato M, Garcia EG, Wünsch Filho V. Antracnose do morangueiro ("Flor Preta") causada por *Colletotrichum acutatum*. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional* 2007; 32(116):06-10.

75 Farias R. M, Martins CR. Produção Integrada de Frutas - Revisão Bibliográfica. *Revista da FZVA* 2002; 9(1):33-47.

76 Andrigueto JR, Nasser LCB, Teixeira JMA, Simon G, Veras MCV, Medeiros SAF et al. Produção Integrada de Frutas - PIF e Sistema Agropecuário de Produção Integrada - SAPI no Brasil. Ministério da Agricultura; 2008.

77 Dores EFGC, De-Lamonica-Freire EM. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas: vias de contaminação e dinâmica dos pesticidas no ambiente aquático. *Pesticidas*: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente 1999; 9(1):18.

78 Martínez RC, Gonzalo ER, Laespada MEF, Román FJSS. Evaluation of surface- and ground-water pollution due to herbicides in agricultural areas of Zamora and Salamanca (Spain). *Journal of Chromatography A* 2000, 869:471-480. http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01188-7

79 Ribeiro ML, Lourencetti C, Pereira SY, Marchi MRR. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. *Química Nova* 2007, 30(3):688-694. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000300031

80 Dores EFGC, De-Lamonica-Freire EM. Aquatic environment contamination by pesticides. Case study: water used for human consumption in Primavera do Leste, Mato Grosso - preliminary analyses. *Química Nova* 2001; 24(1):27-36. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422001000100007

81 Castillo LE, De La Cruz E, Ruepert C. Ecotoxicology and pesticides in tropical aquatic ecosystems of Central America. *Environmental Toxicology & Chemistry* 1997; 16:41-51. http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620160104

82 Eichelberger JW, Lichtenberg JJ. Persistence of pesticides in river water. *Environmental Science & Technology* 1971; 5:541-544. http://dx.doi.org/10.1021/es60053a002

83 Toassa EC, Machado EHS, Szarfarc SC, Philippi ST, Leal GVS. Alimentos orgânicos e o meio ambiente. *Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition* 2009; 34(1):175-184.

84 Associação de Agricultura Orgânica – AAO. *Agricultura orgânica* [cited 2011 nov.]. Available from: http://aao.org.br/aao/.

85 Brasil. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Decreto nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007. Regulamenta a Lei no 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências [cited 2011 nov.].

Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2007 dez. 28. Available from: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/Decreto/D6323.htm.

86 Brasil. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. [cited 2011 nov.]. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 2003 dez. 24. Available from: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/2003/L10.831.htm.

87 Schultz G. Agroecologia, agricultura orgânica e institucionalização das relações com o mercado nas organizações de produtores do Sul do Brasil. *Agrária* 2007; 7:61-93.

88 Azevedo E. AO e suas correntes [cited 2011 nov.]. Portal Orgânico. Available from: http://www.portalorganico.com.br/sub/16/ao_e_suas_correntes

89 Krolow AC, Schwengber J, Ferri N. Avaliações físicas e químicas de morango cv. Aromas produzidos em sistema orgânico e convencional. *Revista Brasileira de Agroecologia* 2007; 2(2):1732-1735.

90 Martins VA, Camargo Filho WP, Bueno CRF. Preços de frutas e hortaliças da agricultura orgânica no mercado varejistas da cidade de São Paulo. *Informações Econômicas* 2006; 36(9):42-52.

91 Borguini RG, Torres EAFS. Alimentos orgânicos: qualidade nutritiva e segurança do alimento. *Segurança Alimentar e Nutricional* 2006; 13(2):64-75.

92 Wan HB, Wong MK. Minimization of solvent consumption in pesticide residue analysis. *Journal of Chromatography A* 1996; 754:43-47. http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00537-7

93 Cajka T, Hajslova J, Lacina O, Mastovska K, Lehotay SJ. Rapid analysis of multiple pesticide residues in fruit-based baby food using programmed temperature vaporiser injection-low-pressure gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2008; 1186: 281294. PMid:18164024. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.009

94 Lehotay SJ. Determination of pesticide residues in nonfatty foods by supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry: Collaborative study. *Journal of AOAC International* 2002; 85(5):1148-1166. PMid:12374416.

95 Prestes OD, Friggi CA, Adaime MB, Zanella R. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova* 2009; 32(6):1620-1634. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000600046

96 Taylor MJ, Hunter KB, Lindsay D, Le Bouhellec S. Multi-residue method for rapid screening and confirmation of pesticides in crude extracts of fruits and vegetables using isocratic liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2002, 982: 225-236. http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01610-2

97 Wilkowska A, Biziuk M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry* 2011;125: 803-812. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.094

98 Schenck FJ, Callery P, Gannett PM, Daft JR, Lehotay SJ. Comparison of magnesium sulfate and sodium sulfate for removal of water from pesticide extracts of foods. *Journal of AOAC International* 2002; 85(5):1177-1180. PMid:12374418.

99 Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 2003; 86(2):412-431. PMid:12723926.

100 Jansson C, Pihlström T, Österdahl BG, Markides KE. A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 2004, 1023:93-104. PMid:14760853. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.019

101 Ortelli D, Edder P, Corvi C. Multiresidue analysis of 74 pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2004, 520:33. http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.037

102 ZamoraT, Pozo OJ, López FJ, Hernández F. Determination of tridemorph and other fungicide residues in fruit samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2004, 1045:137-143. PMid:15378888. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.041

103 Soler C, Mañes J, Pico Y. Liquid chromatography–electrospray quadrupole ion-trap mass spectrometry of nine pesticides in fruits. *Journal of Chromatography*

A 2004, 1048:41-49. PMid:15453417. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.023

104 Falqui-Cao C, Wang Z, Urruty L, Pommier JJ, Montury M. Focused Microwave Assistance for Extracting Some Pesticide Residues from Strawberries into Water before Their Determination by SPME/HPLC/DAD. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49:5092-5097. PMid:11714287. http://dx.doi.org/10.1021/jf010519u

105 Papadakis EN, Vryzas Z, Papadopoulou-Mourkidou E. Rapid method for the determination of 16 organochlorine pesticides in sesame seeds by microwave-assisted extraction and analysis of extracts by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2006, 1127(1-2):6-11. PMid:16797565. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.06.010

106 Chen L, Ding L, Jin H, Song D, Zhang H, Li J et al. The determination of organochlorine pesticides based on dynamic microwave-assisted extraction coupled with on-line solid-phase extraction of high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 2007; 589(2):239-246. PMid:17418187. http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2007.03.003

107 Nagami H. Multiresidue analysis of fungicides in strawberry. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology* 1997; 58:53-60. PMid:8952925. http://dx.doi.org/10.1007/s001289900299

108 Albero B, Sánchez-Brunete C, Tadeo JL. Multiresidue determination of pesticides in juice by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 2005; 66:917-924. PMid:18970072. http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2004.12.046

109 Topuz S, Özhan G, Alpertunga B. Simultaneous determination of various pesticides in fruit juices by HPLC-DAD. *Food Control* 2005; 16(1):87-92. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2003.11.012

110 Ceshing S, Hui-Chi C. Simultaneous determination of macrolide pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis* 2009; 17(3):198-208.

111 Yang X, Zhang H, Liu Y, Wang J, Zhang YC, Dong AJ et al. Multiresidue method for determination of 88 pesticides in berry fruits using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry: Determination of 88 pesticides in berries using SPE and GC-MS. *Food Chemistry* 2011; 127(2):855-865. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.024

112 Hu R, Hennion B, Urruty L, Montury M. Solid phase microextraction of pesticide residues from strawberries. *Food Additives and Contaminants* 1999; 16(3):111-117. PMid:10492703. http://dx.doi.org/10.1080/026520399284154

113 Lambropoulou DA, Albanis TA. Headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography–mass spectrometry for the rapid screening of organophosphorus insecticide residues in strawberries and cherries. *Journal of Chromatography A* 2003; 993:197-203. http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00397-2

114 Chai MK, Tan GH. Validation of a headspace solid-phase microextraction procedure with gas chromatography-electron capture detection of pesticide residues in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 2009; 117:561. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.034

115 Liu M, Yuki H, Song Y, Lin J. Determination of Carbamate and Organophosphorus Pesticides in Fruits and Vegetables Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry with Dispersive Solid Phase Extraction. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 2006, 34(7):941-945. http://dx.doi.org/10.1016/S1872-2040(06)60045-5

116 Radisc M, Grujic S,Vasiljevic T, Lausevic M. Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 2009; 113:712-719. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.103

117 Haib J, Hofer I, Renaud JM. Analysis of multiple pesticide residues in tobacco using pressurized liquid extraction, automated solid-phase extraction clean-up and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2003, 1020:173-187. PMid:14661742. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2003.08.049

118 Tanaka T, Hori T, Asada T, Oikawa K, Kawata K. Simple one-step extraction and cleanup by pressurized liquid extraction for gas chromatographic–mass spectrometric determination of pesticides in green leafy vegetables. *Journal of Chromatography A* 2007; 1175:181-186. PMid:17996881. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.060

119 Soler C, James KJ, Pico Y. Capabilities of different liquid chromatography tandem mass spectrometry systems in determining pesticide residues in food: Application to estimate their daily intake *Journal of*

Chromatography A 2007; 1157:73-84. PMid:17466998. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.009

120 Pat S, Bart T, Frank D. Multi-residue screening of pesticides in vegetables, fruits and baby food by stir bar sorptive extraction–thermal desorption–capillary gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2003; 1000:299-309. http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00508-9

121 Juan-García A, Mañes J, Font G, Pico Y. Evaluation of solid-phase extraction and stir-bar sorptive extraction for the determination of fungicide residues at low-μg kg^{-1} levels in grapes by liquid chromatography–mass spectrometry *Journal of Chromatography A* 2004; 1050(2):119-127. PMid:15508304. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.026

122 Lehotay SJ, Mastovská K, Yun SJ. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *Journal of AOAC International* 2005; 88(2):630-638. PMid:15859091.

123 Lehotay SJ. *Pesticide Analysis in Methods in Biotechnology*. Edited by Martínez JL, Martinez V, Frenich AG. Humana Press; 2004.

124 Lehotay SJ, De Kok A, Hiemstra M, Bodegraven P. Validation of a fast and easy method for the determination of 229 pesticide residues in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *Journal of AOAC International* 2005; 88(2):595-614. PMid:15859089.

125 Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe - QuEChERS. A Mini-Multiresidue method for the analysis of pesticide residues in low-fat products [cited 2011 sept.]. QuEChERS; 2011. Available from: http://www.quechers.com/

126 Lehotay SJ, Son KA, Kwon H, Koesukwiwat U, Fu W, Mastovska K et al. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A* 2010, 1217:2548-2560. PMid:20144460. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.044

127 Lehotay SJ, Anastassiades M, Majors RE. QuEChERS, a sample preparation technique that is "Catching On": An up-to-date interview with the inventors. *LCGC North America* 2010; 28(7):504-516.

128 Lehotay SJ, Mastovská, K, Lightfield, AR. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of AOAC International* 2005;88(2):615-629. PMid:15859090.

129 Lanças FM. *Extração em Fase Sólida - SPE*. São Carlos: Editora Rima; 2004.

130 Prestes OD, Adaime, MB, Zanella R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Scientia Chromatographica* 2011; 3:51-64. http://dx.doi.org/10.4322/sc.2011.004

131 Torres CM, Pico Y, Manes J. Determination of pesticide residues in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A* 1996; 754: 301-331. http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00407-4

132 Vidal JLM, Arrebola FJ, Sánchez MM. Application of gas chromatography–tandem mass spectrometry to the analysis of pesticides in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A* 2002; 959:203-213. http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00444-2

133 Blasco C, Fernández M, Pico Y, Font G, Mañes J. Simultaneous determination of imidacloprid, carbendazim, methiocarb and hexythiazox in peaches and nectarines by liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2002; 461:109-116. http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00255-6

134 Hiemstra M, Kok A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2007; 1154:3-25. PMid:17442324. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.123

135 Lanças FM. *Cromatografia Líquida Moderna.* Campinas: Editora Átomo; 2009.

136 Lanças FM. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas*:* finalmente "compatíveis"*?*. *Scientia Chromatographica* 2009; 1(2):35-61.

137 Meyer VR. *Practical High Performance Liquid Chromatography*. 4rd@#@ed. Local: John Wiley & Sons; 2004.

138 Collins CH, Braga GL, Bonato PS. *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas: Editora da UNICAMP; 2006.

139 Holler FJ, Skoog DA, Crounch SR. *Princípios de Análise Instrumental*. 6rd@#@ed. Porto Alegre: Editora Bookman; 2009.

140 Abad A, Moreno MJ, Pelegrı R, Martinez MI, Saez A, Gamon M et al. Determination of carbaryl,

carbofuran and methiocarb in cucumbers and strawberries by monoclonal enzyme immunoassays and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: An analytical comparison. *Journal of Chromatography A* 1999; 833:3-12. http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00856-5

141 Malik AK, Blasco C, Pico Y. Liquid chromatography–mass spectrometry in food safety. *Journal of Chromatography A* 2010, 1217:4018-4040. PMid:20392451. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.03.015

142 Hajslova J, Zrostlıkova J. Matrix effects in (ultra) trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. *Journal of Chromatography A* 2003, 1000:181-197. http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00539-9

143 Vekey K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *Journal of Chromatography A* 2001; 921:227. http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00825-1

144 Fernandez M, Rodrıguez R, Pico Y, Manes J. Liquid chromatographic–mass spectrometric determination of post-harvest fungicides in citrus fruits. *Journal of Chromatography A* 2001; 912:301-310. PMid:11330799. http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00576-3

145 Frenich AG, Vidal JLM, López-López T, Cortés AS, Martínez IS. Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2004; 1048:199-206. PMid:15481257. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.027

146 García-Reyes JF, Ferrer C, Gómez-Ramos MJ, Molina-Díaz A, Fernández AAR. Determination of pesticide residues in olive oil and olives. *Trends in Analytical Chemistry* 2007; 26(3):239-251. http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.004

147 Chiaradia MC, Collins CH, Jardim ICSF. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química. Nova* 2008; 31(3):623. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000300030

148 Fernández-Alba AR, García-Reyes JF. Large-scale multi-residue methods for pesticides and their degradation products in food by advanced LC-MS. *Trends in Analytical Chemistry* 2008; 27(11):973-990. http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.009

149 Pihlström T. *Method validation and quality control procedures for pesticides residues analysis in food and feed*. National Food Administration; 2008. Document nº SANCO/10684/2009. Supersedes Document nº SANCO/3131/2007. Implementado em 01/01/2010.

150 Urruty L, Montury M. SPME and pesticide residues in food analysis. Application to strawberries. *Revue. F. S. B.* 2002; 1:5-11.

151 Sagratini A, Mañes J, Giardiná D, Damiani P, Pico Y. Analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2007, 1147:135-143. PMid:17362971. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.066

152 Montero TM, Moll EM, Esteban RM, López-Andréu FJ. Quality attributes of strawberry during ripening. *Scientia Horticulturae* 1996; 65:239-250. http://dx.doi.org/10.1016/0304-4238(96)00892-8

153 Mangas JJ, Moreno J, Suárez B, Picinelli A, Blanco D. Liquid chromatographic analysis of non-volatile strawberry compounds. *Chromatographia* 1998, 47(3-4):197-202. http://dx.doi.org/10.1007/BF02466581

154 Herrera MC, Castro MDL. Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 2004; 379:1106-1112. PMid:15221196. http://dx.doi.org/10.1007/s00216-004-2684-0

155 Silva FL, Escribano-Bailon MT, Alonso JJP, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT* 2007; 40:374. http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.018

Recebido: 09/03/2012
Aceito: 16/03/2012

INSTITUTO INTERNACIONAL DE CROMATOGRAFIA

O Instituto Internacional de Cromatografia (IIC) é parte da Associação Internacional de Cromatografia, entidade de direito privado, sem fins lucrativos.

Os objetivos dos cursos do IIC são o aprimoramento/formação/atualização dos usuários das técnicas cromatográficas e afim (Preparo de Amostras, Espectrometria de Massas, Gestão da Qualidade, dentre outras), tanto do ponto de vista teórico quanto prático.

A filosofia educacional do IIC é: "ao invés de ensinar apenas como operar um equipamento específico (dar o peixe) o IIC ensina a técnica (como pescar)".

Os cursos do Instituto Internacional de Cromatografia são coordenados pelos Diretores do IIC, e ministrados pelos coordenadores, auxiliados por uma equipe técnica e científica altamente qualificada, constituída de docentes pós-graduados nos melhores centros do país na área, e pós-graduandos em fase de conclusão de suas teses. Na época em que cada curso for oferecido, uma relação dos instrutores é disponibilizada no website do IIC.

O programa detalhado de cada curso pode ser obtido através de contacto com o IIC.

Os cursos são ministrados com auxílio de recursos audiovisuais modernos (datashow-computador; vídeos, demonstrações, resolução de problemas e outros recursos instrucionais). Os alunos recebem um livreto contendo cópia de todos os slides apresentados pelos instrutores, além de material bibliográfico de apoio. Em vários cursos também são fornecidos livros de autoria dos próprios docentes dos cursos. A maior parte dos cursos também tem aulas práticas de laboratório, conforme anunciado no folheto explicativo de cada curso.

Observações:

- O I.I.C. oferece também cursos "*in-house*" ("*in-company*"). Interessados nesta modalidade devem contatar o IIC para obter mais detalhes.
- Com exceção dos cursos da área da qualidade (ISO, Validação e Auditoria) todos os demais possuem aulas teóricas e práticas de laboratório.
- O oferecimento efetivo de um curso depende de um número mínimo de inscritos no mesmo.
- O número de vagas dos cursos que envolvem laboratório está sendo limitado para melhor aproveitamento dos participantes.
- Visite o *website* www.iicweb.org para obter mais informações.

CALENDÁRIO GERAL

EVENTOS 2012

"HTSP-2": Symposium on Hyphenated Techniques for Sample Preparation
Data: 31 janeiro-1 fevereiro
Local: Bruges, Belgium
Informações: www.ordibo.be/htc

"HTC-12": Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Analysers
Data: 1-3 fevereiro
Local: Bruges, Belgium
Informações: www.ordibo.be/htc

Microscale BioSeparations
Data: 12-15 fevereiro
Local: Genebra, Switzerland
Informações: www.msb2012.org

Pittsburg Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy
Data: 11-16 março
Local: Orlando (FL), USA
Informações: www.pittcon.org

Analytica 2012
Data: 17-20 abril
Local: Munich, Germany
Informações: www.analytica.de

XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq
Data: 19-22 maio
Local: Foz do Iguaçu (PR)
Informações: www.sbbq.iq.usp.br

35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ
Data: 28-31 maio
Local: Águas de Lindóia (SP)
Informações: www.sbq.org.br/35ra

EVENTOS 2012

HPLC 2012
Data: 16-21 junho
Local: Anaheim, USA
Informações: www.cass.org

ACHEMA 2012-04-12
Data: 18-22 junho
Local: Frankfurt, Germany
Informações: www.achema.de

IV Congresso Brasileiro de Toxicologia Clínica e I Simpósio Brasileiro de Toxicologia Analítica
Data: 22-24 agosto
Local: Águas de Lindóia (SP)
Informações: www.toxicologiaclinica2012.fcm.unicamp.br

4th International IUPAC conference on Green Chemistry
Data: 25-29 agosto
Local: Foz do Iguaçu (PR)
http://congresscentral.com.br/sbq/ufscar/icgc4/index.php

International Symposium on Chromatography (ISC 2012)
Data: 09-13 setembro
Local: Torun, Poland
Informações: www.isc2012.pl

XIV Congresso Latino-Americano de Cromatografia (COLACRO XIV)
Data: 01-05 outubro
Local: Florianópolis (SC)
Informações: www.colacro.org

BOOKSTORE

O *Bookstore* divulgará o material de informação e formação produzido pelo IIC, incluindo Livros, filmes, slides, material didático de cursos e outras formas de divulgação dos materiais por ele produzido. Esses materiais podem ser adquiridos do IIC através do *website* www.iicweb.org/biblioteca.php

Cromatografia Líquida Moderna - *Fernando M. Lanças*

Livro publicado pela Editora Átomo em maio de 2009, aborda de forma simples e didática os principais assuntos relacionados à Cromatografia Líquida Moderna (HPLC ou CLAE), desde a Teoria, Instrumentação, Colunas, Detectores, até aspectos da Validação, Preparo da Amostra e Análise Quantitativa.

O IIC recomenda este livro para todos os interessados em iniciar-se ou atualizar-se nesta técnica.

Cromatografia em Fase Gasosa - *Fernando M. Lanças*

Livro de autoria do Prof. Lanças, abordando todos os princípios básicos: instrumentação, análise qualitativa e quantitativa, detectores e muitos outros aspectos da Cromatografia Gasosa.

Altamente recomendado para os iniciantes na técnica, os quais encontrarão explicações detalhadas e simples a respeito da maior parte dos fundamentos básicos da técnica.

Validação de Métodos Cromatográficos - *Fernando M. Lanças*

Livro de autoria do Prof. Lanças, descreve os princípios da validação de métodos cromatográficos com detalhes. Enfoque também a validação de instrumentação e a adequação dos sistemas ("system suitability") frente aos requisitos dos órgãos regulamentadores de resultados analíticos. O livro é acompanhado de um *software*, denominado *Validate* – versão demonstração – desenvolvido em colaboração com o Dr. Vitor Hugo P. Pacces, o qual auxilia no processo de validação.

Extração em Fase Sólida - *Fernando M. Lanças*

De autoria do Prof. Lanças, este livro apresenta e discute as várias formas de extração em fase sólida (SPE), desde a mais clássica empregando cartuchos até as mais atuais como discos, placas, ponteiras, e outras. Também discute os princípios da micro extração em fase sólida (SPME) e da extração por sorção em barras de agitação (SBSE).

CALENDÁRIO DE CURSOS 2012

1º. Semestre

15 a 18/Maio: Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas: LC/MS/MS - Teoria e Prática em Laboratório
22 e 23/Maio: Como desenvolver e otimizar um Método em HPLC (Teoria e Prática)

11 a 13/Junho: Cromatografia Líquida Moderna (Teoria e Prática)
26 a 29/Junho: Introdução às Técnicas Cromatográficas

2º. Semestre

11 a 13/Julho: Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) em Laboratórios: Fundamentos
16 e 17/Julho: Validação de Métodos Cromatográficos

02 e 03/Agosto: Estimativa da Incerteza em Medidas Analíticas
29 a 31/Agosto: ISO 17025

21 a 23/Novembro: Cromatografia Gasosa: Fundamentos, Instrumentação e Aplicações
05 a 07/Dezembro: Cromatografia Líquida (HPLC ou CLAE): Fundamentos, Instrumentação e Aplicações

Saiba mais em
www.iicweb.org