



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
INSTITUTO DE QUÍMICA

MONOGRAFIA

TÍTULO:

Utilização de Extração em Fase Sólida
para análise de Carbamatos no Pimentão

DISCENTE:

Maria Gleyse de Araújo Cândido

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Henrique Eduardo Bezerra da Silva

Natal, Julho/2017.

Maria Gleyse de Araújo Cândido

MONOGRAFIA

Utilização de Extração em Fase Sólida para análise de Carbamatos no Pimentão

Monografia apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química do Petróleo.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Henrique Eduardo Bezerra da Silva

Natal, Julho/2017.

Utilização de Extração em Fase Sólida para análise de Carbamatos no
Pimentão

MARIA GLEYSE DE ARAÚJO CÂNDIDO

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Henrique Eduardo Bezerra da Silva

Orientador

Profa. Dra. Maria de Fátima de Vitória de Moura

Co-orientadora

Prof. Dr. Jailson Vieira de Melo

Membro

RESUMO

O pimentão (*Capsicum annuum L.*) é uma das hortaliças mais produzidas e consumidas em nosso país. Essa hortaliça assim como todas as outras necessitam de um controle de qualidade para garantir a qualidade do produto que chega às mesas do consumidor, de maneira que não provenha de um cultivo danoso ao meio ambiente ou que termine por prejudicar a saúde humana. Partindo desse princípio, este trabalho utilizou o Método de Extração em Fase Sólida (do inglês *Solid Phase Extraction* - SPE) para concentrar e extrair carbamatos de pimentões vendidos nos supermercados da cidade de Natal. A escolha dos carbamatos se deve ao crescimento de sua utilização perante os outros agrotóxicos existentes no mercado. Sendo este menos tóxico para saúde humana, mas ainda tóxico para fauna e flora. Alguns fatores foram testados para a melhora da extração, como a utilização de carvão ativado e solução tampão. A verificação da eficiência da extração foi verificada por posterior análise desse analito nos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatograph* - HPLC) onde os teores de carbamatos presentes são verificados.

Palavras-chave: Carbamatos, pimentão, SPE, Extração em Fase Sólida.

ABSTRACT

Green pepper (*Capsicum annuum L.*) is one of the vegetables most produced and consumed in our country. This vegetable as well as all others need a quality control to guarantee the quality of the product that comes to the tables of the consumer, so that it does not come from a crop harmful to the environment or that ends up harming human health. Based on this principle, this work utilized the Solid Phase Extraction (SPE) method to concentrate and extract chili carbamates sold in supermarkets in the city of Natal. The choice of carbamates is due to the increase in their use compared to other pesticides in the market. This being less toxic to human health, but still toxic to fauna and flora. Some factors were tested for improved extraction, such as the use of activated carbon and buffer solution. The extraction efficiency was verified by further analysis of this analysis in the extracts by High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) where the levels of carbamates present are verified.

Keywords: Carbamates, Green pepeer, SPE, Solid Phase Extraction.

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me apoiaram e incentivaram na busca pelo conhecimento e não mediram esforços em me proporcionarem recursos para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, aos meus pais, obrigada por tudo. Sem vocês eu não seria nada.

Às minhas amigas Aline, Fernanda, Glécia e todas as outras que contribuíram para uma experiência inesquecível nessa universidade. Ao meu amigo Boris, que sempre esteve ao meu lado em todas as situações que precisei. Sem vocês não teria suportado tantas provas, trabalhos e dificuldades nesse curso.

A Karina, agora mestre em química, que participou desse projeto e teve comigo toda a paciência e carinho do mundo durante todo esse tempo.

Aos docentes dessa universidade, em especial aos Professores Fabiano do Espírito Santo Gomes e Luís Seixas das Neves, pelas conversas, conselhos e paciência.

À professora Maria de Fátima Vitória de Moura, minha co-orientadora, e ao Professor Henrique Eduardo Bezerra da Silva, meu orientador, obrigada por todo suporte e apoio.

Enfim, quero deixar aqui o meu muito obrigada a todos que estiverem envolvidos direta ou indiretamente na minha vida durante o período em que estive na UFRN.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHC	Hexaclorociclohexano
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
EFS	Extração em Fase Sólida
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Parte por milhão
ppt	Parte por trilhão
SPE	Solid Phase Extraction

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 01: Pimentões.....	15
Figura 02: Fórmula geral dos carbamatos.....	17
Figura 03: Fórmula estrutural do aldicarbe, aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona.....	18
Figura 04: Fórmula estrutural do Carbaril.....	18
Figura 05: Fórmula estrutural do Carbofurano e do 3-hidroxicarbofurano	19
Figura 06: Fórmula estrutural do Metiocarbe.....	19
Figura 07: Fórmula estrutural do Metomil.....	19
Figura 08: Fórmula estrutural do Oxamil.....	20
Figura 09: Fórmula estrutural do Propoxur.....	20
Figura 10: Sistema seringa e cartucho em SPE.....	22
Figura 11: Cartucho típico empregado em SPE.....	22
Figura 12: Etapas envolvidas na extração em fase sólida.....	23
Figura 13: Fluxograma de preparação das amostras.....	29
Figura 14: Amostras antes da extração (a) sem carvão ativado e (b) com carvão ativado.....	31
Figura 15: Amostras após centrifugação (a) sem carvão ativado e (b) com carvão ativado.....	32
Figura 16: SPE.....	32
Figura 17: Cromatograma Carbamatos nas amostras de pimentão.....	33
Figura 18: Amostras padrão mix de carbamatos (a) 0.5 ppm e (b) 10 ppm.....	33
Figura 19: Amostras carvão ativado (a) com tampão (b) com tampão e fortificada (c) e (d) apenas carvão.....	34
Figura 20 Amostras (a) somente tampão e (b) tampão fortificada.....	35

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 01: Características comparativas entre SPE on-line e off-line.....	21
Tabela 02: Exemplos de sorventes utilizados em EFS.....	24
Tabela 03: Guia para seleção de fase sólida e eluente, empregando amostras orgânicas contendo analitos com massas molares inferiores a aproximadamente 2000 daltons.....	26
Tabela 04: Parâmetros dos pesticidas selecionados para estudo (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, IUPAC).....	26
Tabela 05: Parâmetros utilizados para avaliar a presença de carbamatos nas amostras.....	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1. Pimentão	15
3.2. Agrotóxicos	16
3.3. Extração	20
4. METODOLOGIA	27
4.1. REAGENTES, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	27
4.1.1. Reagentes	27
4.1.2. Materiais	27
4.1.3. Equipamentos	28
4.2. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES	28
4.2.1. Preparação da solução tampão	28
4.2.2. Preparação das amostras	28
4.3. PROCEDIMENTOS PARA EXTRAÇÃO	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÕES	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população foi exponencial em relação ao cultivo de alimentos no decorrer da história humana. Isso fez com que se buscassem alternativas para o aumento da produção de alimentos e, também para o combate as pragas que apareciam em cada cultura cultivada.

Uma das hortaliças mais consumidos no Brasil é o pimentão. Por esse motivo ele foi escolhido como objeto de estudo para esse trabalho. O pimentão (*Capsicum annuum* L.) faz parte da família das solanáceas, que é uma família de plantas que cresce com mais abundância nas regiões quentes. E, por isso tem boas condições de cultivo na região nordeste. Tem sua origem no continente americano e pode ser cultivado em qualquer época do ano (MONTEIRO, GOMES, *et al.*, 2009). Possui grande importância no mercado nacional de hortaliças, por ter retorno rápido do capital investido (ALBUQUERQUE, SILVA, *et al.*, 2011).

Com o aparecimento das pragas nas lavouras fez-se necessário à utilização de substâncias que auxiliem no combate a estas e, conseqüentemente no aumento na produção de alimentos. Entretanto, a utilização de substâncias químicas para este fim vem desde a antiguidade clássica. Existem registros em escrituras gregas e romanas que mencionam a utilização de substâncias no controle de insetos por volta de 3.000 atrás (FILHO, 2002).

Todavia, o que surgiu como forma de combate as pragas também apresentou sua face negativa. Em meados da década de 70, ocorreu o aparecimento de alguns casos de contaminação ambiental e problemas de saúde pública devido ao abuso da utilização dos agrotóxicos na agricultura (FILHO, 2002). As intoxicações podem se dar de maneira aguda ou crônica. E os sintomas são desde cólicas, vômitos, convulsões, abortos, malformações fetais ou até a morte (INCA, 2015). Os efeitos dos agrotóxicos na saúde vêm sendo objeto de estudo de profissionais da saúde. Estes, por sua vez, detectaram a presença dessas substâncias em amostras de sangue, leite materno e em alimentos consumidos pela população (SIQUEIRA e KRUSE, 2008).

Dos agrotóxicos existentes no mercado os mais utilizados são os organofosforados, organoclorados e os carbamatos. Os carbamatos vem ganhando mercado devido a sua baixa toxicidade em comparação aos outros. O pimentão,

além de ser muito consumido também é uma das hortaliças que apresentam maior utilização de agrotóxicos (PARA, 2016). Por esses motivos esse trabalho teve por objetivo analisar carbamatos em amostras de pimentões vendidos na cidade de Natal para verificar se suas concentrações encontram-se dentro dos limites permitidos pela ANVISA.

As análises foram realizadas em duas etapas, sendo que a primeira consistiu na concentração das amostras por meio de extração em fase sólida, sendo este um método preparativo que precede à análise por cromatografia. E, a segunda etapa consistiu da submissão dos extratos à análise por cromatografia líquida de alta eficiência para avaliação da eficiência da extração e confirmação da presença dos carbamatos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Pesquisar carbamatos em amostras de pimentão.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método de extração de carbamatos em amostras de pimentão.
- Desenvolver um planejamento experimental fim de verificar o melhor conjunto de parâmetros a serem aplicados na preparação das amostras.
- Aplicar a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para a identificação da presença de carbamatos em pimentão.
- Aplicar a Cromatografia Líquida para determinação das quantidades de carbamatos em pimentão.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Pimentão

Originário da América Central, em específico do México e dos Andes, o pimentão está entre as hortaliças mais cultivadas e consumidas em nosso país. Isso se deve a esta ser uma cultura de clima tropical, que é o predominante em nosso país, especialmente na região nordeste. Ocupa uma área de aproximadamente 13.000 hectares e uma produção por volta de 350 mil toneladas no país, sendo os estados de São Paulo e Minas Gerais os maiores produtores (LOPES e ÁVILA, 2003).

Ele pode se apresentar na cor verde, que é a mais comum, vermelha, além das espécies híbridas que variam na coloração de marfim à púrpura, como mostrado na figura 01 logo abaixo. As flores são simples de pétalas brancas (CAMARGO e RODRIGUES). São ricos em vitaminas A, C e E, sais de cálcio, sódio e ferro (REIFSCHNEIDER, 2000). Em relação a vitamina C, o pimentão apresenta maior concentração do que frutas como laranja e limão, atendendo a necessidade diária do corpo humano (MATHIAS, 2015). Entretanto ele perde cerca de 60% dessa vitamina caso seja cozido. Pode ser conservado de 2 a 4 dias em temperatura ambiente e, na geladeira este tempo é estendido para pouco mais de uma semana. É consumido cru ou cozido, sendo utilizado em pratos variados como saladas e preparos de molhos (HORTALIÇAS).

Figura 1 Pimentões



Fonte: (HORTALIÇAS)

A faixa de temperatura ideal para o plantio do pimentão varia de 21 à 27 graus célsius. A colheita pode ser realizada de 100 à 110 dias após o plantio, sendo este tempo estendido caso o plantio tenha sido realizado em estufa (MATHIAS, 2015).

No último relatório do PARA, de 2015, foram analisadas 243 amostras de pimentão de todo o país, foram detectados a presença de 59 agrotóxicos. Em 214 amostras foram detectados a presença de agrotóxicos não autorizados.

3.2. Agrotóxicos

A utilização de substâncias que atuam no controle de doenças e pragas em plantações data de antes de cristo, no período conhecido como antiguidade clássica. Gregos e romanos citam em algumas de suas escrituras o uso de arsênico para o controle de insetos. Os chineses utilizaram piretrina, um composto orgânico obtido de uma espécie de flor, como inseticida há cerca de 2.000 anos atrás. No ano de 1885, foi descoberta a ação fungicida do sulfato de cobre. Já no ano de 1890 o cloreto de mercúrio começou a ser utilizado como bactericida (FILHO, 2002).

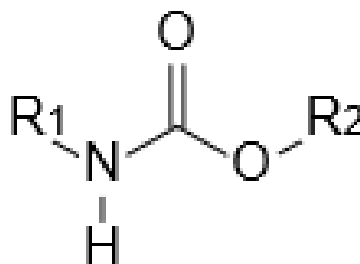
Desde então, a utilização desses compostos químicos teve seu uso amplificado no final do século XIX e início do século XX. Nessa época os produtos tinham como base flúor, arsênico, mercúrio, selênio, chumbo, bórax e sais de zinco e cobre o que ficou conhecido, posteriormente, como *primeira geração de agrotóxicos*. Como se vê a maioria das substâncias utilizadas é altamente tóxica para humanos, plantas e animais (FILHO, 2002). Entretanto, nessa época era visado apenas a eficiência obtida no combate as pragas, não era debatido ou estudado os efeitos desses compostos como é hoje.

Em 1932 teve início a segunda geração de agrotóxicos com a síntese do primeiro inseticida, o *Lethane 384*, sintetizado a partir do tiocianato. No entanto, foi durante a Segunda Guerra Mundial que ocorreu a disseminação e utilização de biocidas sintetizados. Durante e um pouco após esse período foram descobertos o DDT e BHC, agrotóxicos que foram muito utilizados. No ano de 1946, no Brasil, teve início a utilização de organoclorados na agricultura. E, com o uso abusivo de agrotóxicos no mundo, no ano de 1962 a pesquisadora Rachel Carson publicou o livro *Silent Spring*, onde ressaltava os riscos tanto a saúde humana quanto a fauna e flora e a necessidade de mudanças urgentes. Na busca por produtos que

apresentem menor toxicidade ao ambiente e ao homem surgiu na década de 60 a terceira geração de agrotóxicos (FILHO, 2002).

As três classes de agrotóxicos mais utilizados são os organofosforados, organoclorados e carbamatos, figura 2. Sendo os organofosforados os mais utilizados no mundo devido os organoclorados terem sofrido uma restrição sobre sua utilização. Os organofosforados são muito utilizados para controle de diversas pragas e doenças no campo. Todavia, tem sido relatado que os organofosforados podem afetar o sistema nervoso além de serem carcinógenos e disruptores endócrinos¹ (HAN, WANG, *et al.*, 2013).

Figura 2 Fórmula geral dos carbamatos



Fonte: (OLIVEIRA, 2017)

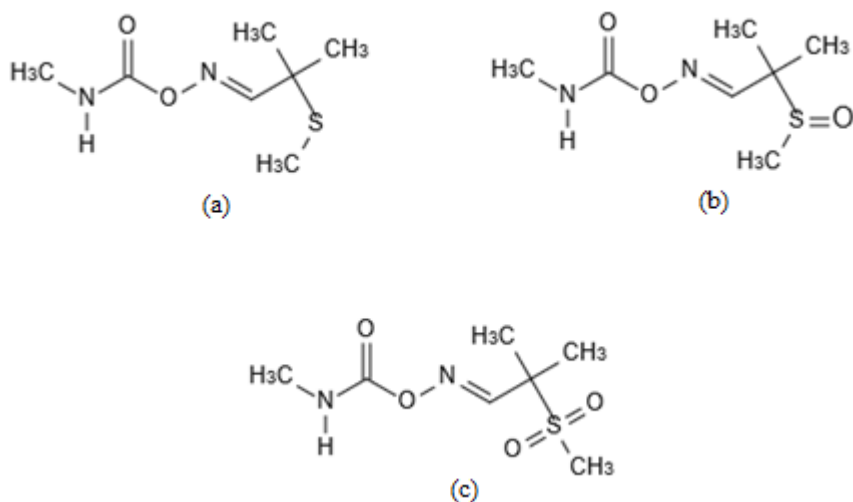
Existem vários tipos de carbamatos, foi escolhido um grupo de 10 deles para efetuar a concentração e análise no pimentão. Destes, nenhum deles é permitido em nenhuma concentração nessa cultura. Abaixo estão listados esses 10 carbamatos bem como a função exercida por cada um.

- **Aldicarbe, Aldicarbe sulfóxido e Aldicarbe sulfona**

Foi introduzido no mercado nos anos 70 quando foi sintetizado por L. K. Payne e M. H. J. Weiden. É utilizado em diversas culturas, como algodão, banana e feijão como inseticida sistêmico, acaricida e nematicida. Sua utilização deve ser em locais longe de lençóis freáticos devido a possível contaminação (LARINI, 1999). O aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona, são sintetizados a partir da oxidação do aldicarbe. A figura 03 abaixo apresenta suas estruturas.

¹ Substâncias químicas capazes de simular ou alterar o sistema hormonal de seres humanos e animais, prejudicando o funcionamento normal dos sistemas imunológico, nervoso e endócrino. (PONTELLI, NUNES e OLIVEIRA, 2015)

Figura 3 Fórmula estrutural do aldicarbe (a), aldicarbe sulfóxido (b) e aldicarbe sulfona (c)

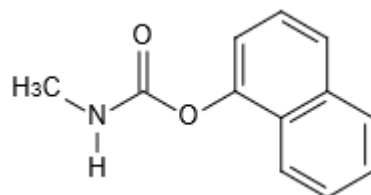


Fonte: (OLIVEIRA, 2017)

- **Carbaril**

É um sólido branco e cristalino pouco solúvel em água, mas com certa solubilidade em solventes orgânicos. É utilizado na agricultura e no uso doméstico como inseticida (LARINI, 1999). Sua estrutura é mostrada abaixo na figura 04.

Figura 4 Fórmula estrutural do Carbaril

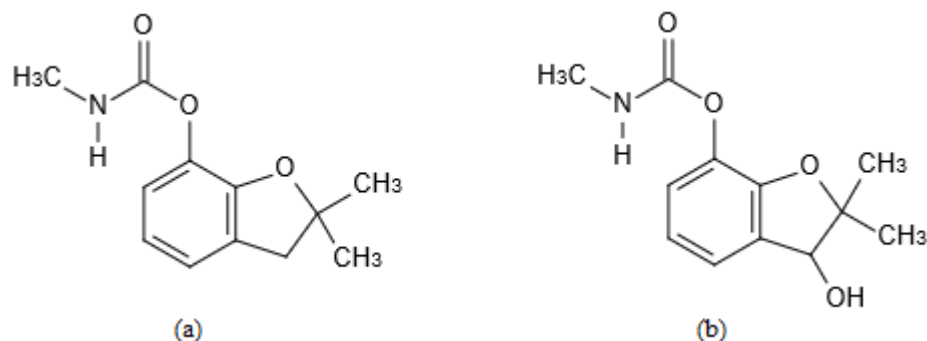


Fonte: (OLIVEIRA, 2017)

- **Carbofurano e 3-hidroxicarbofurano**

Por meio de degradação e hidroxilação do Carbofurano é formado o 3-hidroxicarbofurano. É utilizado com inseticida e nematicida nas culturas de arroz, banana, trigo, dentre outras (LARINI, 1999). A estrutura do Carbofurano, bem como do 3-hidroxicarbofurano é apresentada a seguir na figura 05.

Figura 5 Fórmula estrutural do Carbofurano (a) e do 3-hidroxicarbofurano (b)

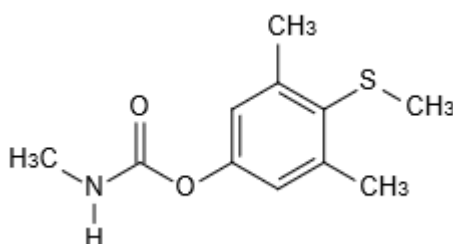


Fonte: (OLIVEIRA, 2017)

- **Metiocarbe**

É usado como acaricida, inseticida e moluscicida em culturas como berinjela e tomate. Além de servir também como repelente para pássaros (LARINI, 1999). Abaixo, na figura 06, é apresentada sua formula estrutural.

Figura 6 Fórmula estrutural do Metiocarbe

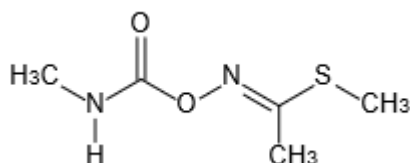


Fonte: (OLIVEIRA, 2017)

- **Metomil**

É utilizado em diversas culturas com algodão, batata e milho como inseticida. Provém da biotransformação do tiocarb. Apresenta leve odor sulfuroso e alta solubilidade em solventes orgânicos, metanol, etanol e acetona (LARINI, 1999). A figura 07 mostra sua estrutura logo abaixo.

Figura 7 Fórmula estrutural do Metomil

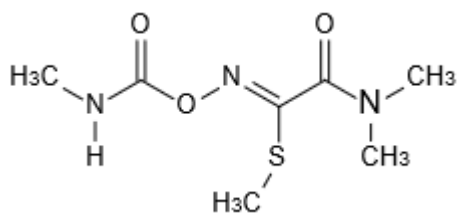


Fonte: (OLIVEIRA, 2017)

- **Oxamil**

É utilizado em culturas como algodão e tomate agindo como acaricida e inseticida. É mortal em caso de ingestão ou inalação, sendo extremamente tóxico para animais e plantas (OXAMIL 42% SCA). Sua estrutura é mostrada na figura 08 logo abaixo.

Figura 8 Fórmula estrutural do Oxamil

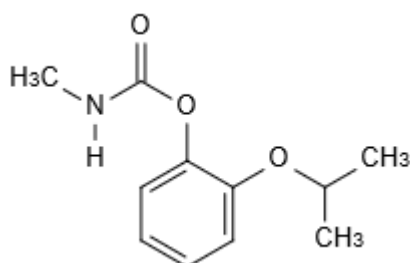


Fonte: (OLIVEIRA, 2017)

- **Propoxur**

É utilizado em culturas de alho, ameixa, cacau, dentre outras, como inseticida não sistêmico (LARINI, 1999). Também é utilizado no controle do vetor malária além do uso no combate a insetos domésticos. A figura 09 apresenta sua fórmula estrutural a seguir.

Figura 9 Fórmula estrutural do Propoxur



Fonte: (OLIVEIRA, 2017)

3.3. Extração

Existem diversas técnicas analíticas utilizadas para realização de extração, também conhecida como pré-concentração. Dentre essas técnicas estão a extração líquido-líquido, extração em fase sólida, extração com fluido supercrítico e extração com membranas sólidas (diálise e ultrafiltração) ou líquidas (QUEIROZ, COLLINS e JARDIM, 2000).

No geral, o analito se apresenta na matriz na concentração de $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (microgramas por quilograma, ppm) a ng.kg^{-1} (nanogramas por quilograma, ppt).

Além disso, os analitos apresentam propriedades diferentes da matriz ao qual pertencem. Então, faz-se necessário o preparo e concentração dessas amostras. O preparo é de grande importância, pois evita que os interferentes da matriz coeluem com o analito de interesse, além de auxiliar na preservação da coluna analítica que é utilizada, por conseguinte a extração. Esta etapa deve ser tão simples quanto possível para que se diminuam erros, seja rápida e com menor custo (JARDIM, 2010).

A escolha da técnica utilizada para preparação da amostra depende das propriedades da matriz e no analito. No que diz respeito a matriz, é verificado o estado físico (sólido, líquido ou gasoso), seu tamanho, pH, a presença de gordura, pigmentos e proteínas, etc.. Em relação ao analito devem-se analisar sua carga, estado físico, massa molar polaridade, volatilidade, dentre outras propriedades físicas e químicas (JARDIM, 2010). Além disso, essas técnicas se dividem em dois tipos, *off-line* e *online*, tabela 1. Sendo *off-line* quando a extração é realizada separada da cromatografia e, *online* quando ambas se encontram no mesmo sistema (QUEIROZ, COLLINS e JARDIM, 2000).

Tabela 1 Características comparativas entre SPE on-line e off-line

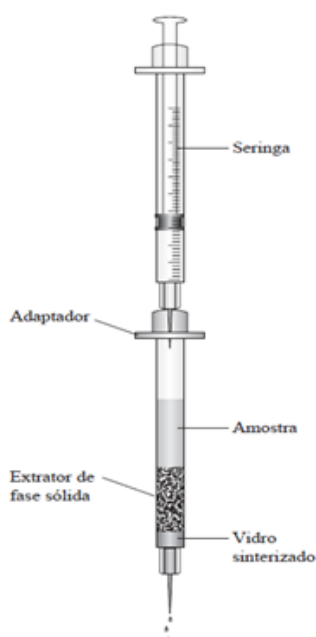
SPE on-line	SPE off-line
Análise de todo extrato;	Análise de uma alíquota do extrato;
Pequenos volumes de amostra são suficientes para obter boa sensibilidade	São necessários volumes elevados de amostra;
Efeitos da matriz; supressão iônica em espectrometria de massas;	Menor efeito matriz em espectrometria de massas;
Cartuchos reutilizáveis	Cartuchos descartáveis;
Menor flexibilidade (a maioria dos sistemas não permite o uso combinado de cartuchos diferentes);	Extração em sequência e a possibilidade de usar combinações de diferentes cartuchos em série;
Automatização e o mínimo de amostra, resultados com melhor precisão e exatidão;	Manipulação da amostra, possibilidade de contaminação, e menor precisão e exatidão;
Rápida eluição da amostra depois da pré-concentração, degradação mínima;	Risco de degradação de alguns compostos (tempo de análise maior);
Consumo mínimo de solventes orgânicos (eluição com a fase móvel);	Consumo mais elevado de solventes orgânicos para eluição;
Nenhuma perda de analito por evaporação;	Possível perda de analitos por evaporação;
Ausência de extratos para verificação ou análise adicional;	Podem ser executadas várias medidas com o mesmo extrato;
Tempo de análise reduzido;	Tempo de análise mais longo;
Alto processamento (extração e análise de amostras em uma sucessão);	Disponibilidade de sistema SPE portáteis para uso no local da coleta;
Sistema de custo elevado.	Sistema de baixo custo

No ano de 1976 a extração em fase sólida começou a ser utilizada como um meio de substituição da extração líquido-líquido (JARDIM, 2010). Apresentando maior eficiência devido ao alto percentual de recuperação e uma melhor separação dos interferentes (CASS e DEGANI, 2001). Além disso, é utilizada uma menor quantidade de solvente orgânico, não há formação de emulsão, pode ser um processo automatizado, há maior disponibilidade de sorventes e pode aumentar seletivamente a concentração do analito. Todavia esse tipo de extração também apresenta aspectos negativos, sendo esses, o tempo de análise, a escolha do analito e o custo do cartucho utilizado, que além de ser caro não pode ser reaproveitado para mais de uma análise (JARDIM, 2010).

Ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido e interações iônicas são as principais forças atuantes entre o analito e o sorvente. Durante o processo de extração pode ser utilizado seringa, disco de extração ou o cartucho, como já citado anteriormente. A EFS é utilizada para extrair analitos semivoláteis e não voláteis de amostras líquidas ou como método de pré-extração com solventes para amostras sólidas.

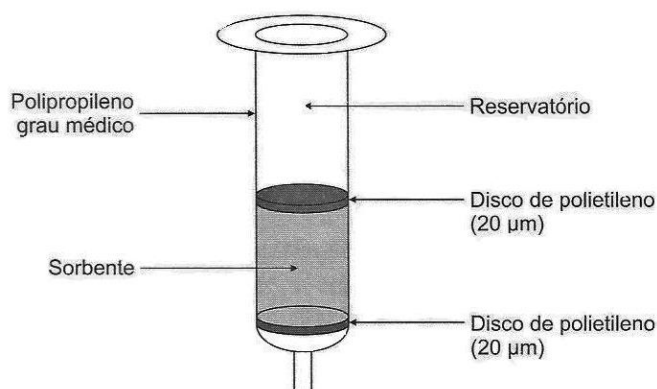
Na figura 10 é mostrado um sistema onde a amostra é colocada por meio de uma seringa. E, na figura 11 é mostrado o cartucho utilizado no processo de extração.

Figura 10 Sistema seringa e cartucho em SPE



Fonte: (SKOOG, CROUCH, *et al.*, 2006)

Figura 11 Cartucho típico empregado em SPE

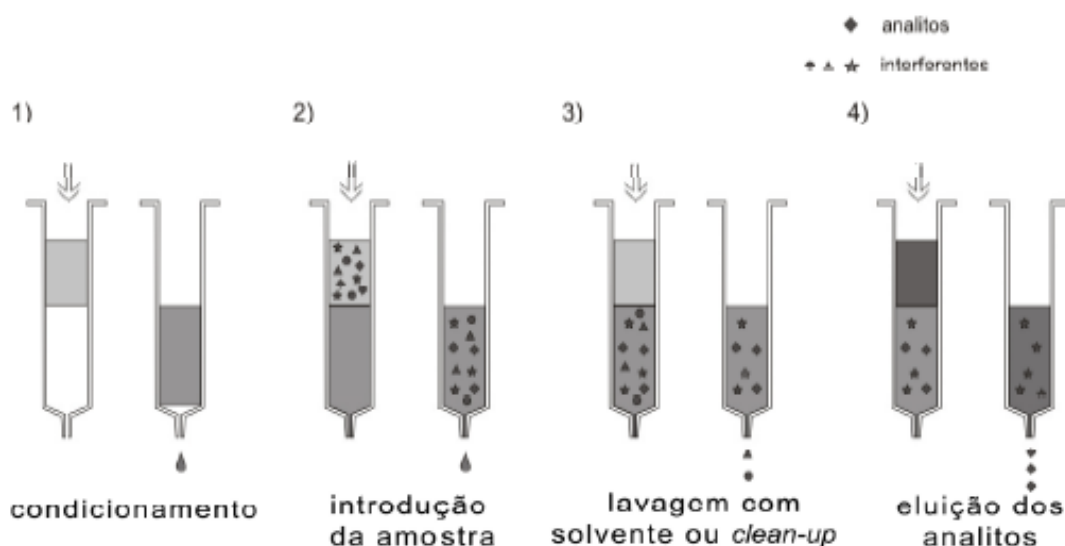


Fonte: (LANÇAS, 2009)

No processo de extração em fase sólida ocorre a adsorção não seletiva do analito em materiais sólidos e posterior dessorção com solventes. (FARIA, 2016) Este processo é dividido em quatro etapas: condicionamento, aplicação da amostra, lavagem e a eluição. Esse processo é mostrado na figura 12.

O condicionamento serve para o ajuste das forças do solvente de eluição com o solvente da amostra. A aplicação da amostra promove a retenção (ou adsorção) do analito. Conhecido também como *clean-up*, o processo de limpeza (ou lavagem) da coluna serve para retirada da maior parte dos interferentes. Por último é realizado a eluição, que é o processo em que os analitos são carregados (ou dessorvidos) por um solvente específico para posterior análise por cromatografia. O tipo de solvente utilizado para o condicionamento depende das características da matriz que será processada. O volume injetado de amostra varia de μL (microlitros) a mL (mililitros). Durante todo o processo deve-se controlar a vazão do solvente no cartucho para que não se permita que venha a secar (JARDIM, 2010). A Figura 12 apresenta todas as etapas envolvidas na aplicação da extração em fase sólida.

Figura 12 Etapas envolvidas na extração em fase sólida



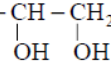

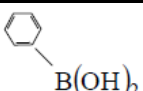


Fonte: (JARDIM, 2010)

Como já mencionado anteriormente a escolha do sorvente a ser utilizado depende de vários fatores, dentre eles está a natureza da matriz e das impurezas a serem eliminadas. A tabela 2 traz a relação de diversos sorventes utilizados na EFS, sendo os mais empregados o C8, C18, carbono grafitizado, resina trocadora iônica e materiais poliméricos como o estireno divinilbenzeno. Para análises ambientais, em

especial de agrotóxicos (herbicidas, inseticidas, organoclorados, etc.), são utilizados sorventes hidrofóbicos não seletivos, como o C18, que foi o utilizado nas análises feitas no presente trabalho. (CALDAS, GONÇALVEZ, *et al.*, 2011).

Tabela 2 Exemplos de sorventes utilizados em EFS

Não polares		
C18	Ocatadecilsilano	$\equiv \text{Si} - (\text{CH}_2)_{17} - \text{CH}_3$
C8	Octilsilano	$\equiv \text{Si} - (\text{CH}_2)_7 - \text{CH}_3$
C2	Etilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$
C1	Metilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_3$
PH	Fenilsilano	$\equiv \text{Si} - $ 
CH	Ciclohexilsilano	$\equiv \text{Si} - $ 
Polares		
FL	Florisol	MgO_3Si
AL	Alumina	Al_2O_3
Si	Sílica	$\equiv \text{Si} - \text{OH}$
CN	Cianopropilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CN}$
2OH	Diolsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{CH}_2 - $ 
NH2	Aminopropilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$
PSA	N-Propiletilenodiaminossilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$
Troca iônica		
SCX	Benzenossulfonilpropilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - $  $- \text{SO}_3^- \text{H}^+$
PRS	Sulfonilpropilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{SO}_3^- \text{Na}^+$
CBA	Carboximetilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$
DEA	Dietilaminopropilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{CH}_2 - \text{CH}_3)_2$
SAX	Trimetilaminopropilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{Cl}^-$
PSA	N-Propiletilenodiaminossilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$
Não polares		
PBA	Ácido fenilborônico	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH} - $ 

Fonte: (QUEIROZ, COLLINS e JARDIM, 2000)

A respeito de alguns sorventes apresentados na tabela 2: para sorventes não polares. O octadecil tem-se como solvente de eluição o metanol para uma matriz aquosa que apresente um analito hidrofóbico. O octil tem como principal aplicação a análise sobre o abuso de drogas, onde o analito apresente anéis aromáticos e o solvente de eluição é a acetonitrila. Também para o monitoramento de drogas, sendo estas terapêuticas, o sorvente é o fenil apresentando como solvente de eluição o metanol acidificado. O etil é utilizado para matrizes tampões onde o grupo funcional do analito são cadeias alquil e o solvente de eluição é o acetato de etila. Sua principal aplicação é na análise de peptídeos. Quando a matriz é um fluido biológico o sorvente utilizado é o cicloexil. Apresentando como solvente de eluição o clorofórmio e tendo sua principal aplicação a análise de pesticidas (QUEIROZ, COLLINS e JARDIM, 2000).

Para sorventes polares: o cianopropil pode ser utilizado em extrações polares, onde a matriz é apolar e o solvente utilizado é o metanol. O diol é utilizado em matrizes de hexano, onde o solvente de eluição utilizado é o isopropanol e o grupo funcional do analito são hidroxilas. Sendo este aplicado para análises metabólicas de vitamina D. A sílica é utilizada para separações de líquidos, onde o grupo funcional do analito é a amina. Possui como matriz óleos e o solvente de eluição é a acetona. Para análises de carboidratos, onde no analito há a presença de heteroátomos e a matriz é o clorofórmio o sorvente é o aminopropil (QUEIROZ, COLLINS e JARDIM, 2000).

Na tabela 3 é mostrado um guia para seleção do sorvente com base no analito e mecanismo a ser empregado durante a EFS.

Tabela 3 Guia para seleção de fase sólida e eluente, empregando amostras orgânicas contendo analitos com massas molares inferiores a aproximadamente 2000 daltons.

Mecanismo	Sorvente	Tipo de Analito	Tipo de Matriz	Eluente do Analito
apolar (fase reversa) partição e adsorção	C18, C8, C2, cicloexil, fenil, cianopropil, polimérico	grupos funcionais apolares como alquilas e aromáticos	soluções polares (tampão aquoso)	solventes polares como metanol, acetonitrila e água com pH ajustado
polar (fase normal) partição e adsorção	sílica, diol, ciano, aminopropil, diamino	grupos funcionais polares como aminas e hidroxilas	solventes apolares, óleos	solventes apolares como hexano e diclorometano
troca iônica	forte (ácido sulfônico) ou fraco (ácido carboxílico)	grupos funcionais carregados positivamente como aminas	aquosa, força iônica baixa	tampão como acetato, citrato e fosfato
troca aniônica	forte (tetra alquilamônio) ou fraco (amino)	grupos funcionais carregados negativamente como ácidos orgânicos	aquosa, força iônica baixa	tampão como fosfato e acetato

Fonte: (Guide to sample preparation, 2016)

Para sorventes utilizados para extrações por troca iônica as aplicações são: análises de catecolaminas, herbicidas, fármacos, ácidos orgânicos, vitaminas, ácidos graxos e fosfatos. Os solventes de eluição são tampões ácidos ou básicos com alta força iônica (QUEIROZ, COLLINS e JARDIM, 2000).

Outro fator muito importante na SPE é o coeficiente de adsorção (K_{oc}). Com ele é possível prever a tendência do pesticida a ficar adsorvido na matriz. Quando as moléculas são solúveis este apresenta um valor baixo (menor que $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) podendo ser rapidamente biodegradado. (SOARES, 2014). Na tabela 4 abaixo são listados alguns pesticidas, sua solubilidade em água e seu coeficiente de adsorção.

Tabela 4 Parâmetros dos pesticidas selecionados para estudo (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, IUPAC)

Pesticida	Cat. uso	Sol. em água (mg L^{-1})	$DT_{50 \text{ solo}}$ (dias)	K_{oc} (mL g^{-1})	GUS	GOSS	
						Dissolvido em água	Associado sedimento
2,4-D*	herbicida	23180	< 7	20	2,05	médio	baixo
Acefato*	inseticida	$7,9 \times 10^{-5}$	< 3	302	0,73	médio	baixo
Carbendazim*	fungicida	8,0	40	400	2,24	alto	baixo
Clorpirifós	inseticida	1,05	50	8151	0,15	alto	alto
Diuron	herbicida	35,6	75,5	813	2,05	alto	alto
Metomil*	inseticida	$5,5 \times 10^{-4}$	7	72	1,81	baixo	médio
Metil paration	inseticida	55	12	240	1,75	alto	baixo

Fonte: (SOARES, 2014)

4. METODOLOGIA

4.1. REAGENTES, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

4.1.1. Reagentes

- Água Ultrapura em sistema Milli-Q
- Água Destilada
- Acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker)
- Ácido Acético 99,7%
- Acetato de sódio tri-hidratado
- Carvão Ativado (C-17)
- Cloreto de Sódio
- Diclorometano p.a., \geq (GC) (SIGMA-ALDRICH)
- Extran Neutro (Merk S.A.)
- Metanol grau HPLC (J. T. Baker)
- Solução 10% Acetonitrila grau HPLC / Água Ultrapura
- Sulfato de Magnésio Anidro
- Tampão pH 5,5

4.1.2. Materiais

- Balões volumétricos de 50 mL e 100 mL
- Balões de fundo redondo
- Béqueres
- Cartuchos para SPE Bond Elut C18 1g 6mL
- Espátulas
- Liquidificador
- Pêra e Pipetador
- Pipeta de Pasteur
- Pipetas de 5 mL, 10 mL e 15 mL
- Tubos de plástico de 50 mL
- Tubos de vidro de 10 mL
- Vial âmbar de 1,5 mL

As vidrarias utilizadas nesse trabalho foram deixadas em banho com solução aquosa de Extran a 1% por 24 horas, sendo deixadas para secar a temperatura ambiente.

4.1.3. Equipamentos

- Balança analítica TECNAL modelo mPA-210
- Bomba a vácuo New Pump
- Capela de exaustão de gases
- Centrífuga Excelsa 4 MOD 280 R
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável de 0,5-10 μ L (Autochaveble Nichipet EX made in Japan) e 20-200 μ L (Kasvi Basic)
- Rotaevaporador LUCADEMA modelo 001
- SPE

4.2. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

4.2.1. Preparação da solução tampão

Partindo do ácido acético 99,7% foi retirado uma alíquota de 2,9 mL para uma balão volumétrico de 50 mL, ao qual foi completado seu volume com água destilada.

Uma alíquota de 10 mL foi separada da solução de ácido acético 1 M em um balão volumétrico de 100 mL. Nesse balão foi acrescentado 12,38 gramas de acetato de sódio e completado seu volume com água destilada. Após isso seu pH foi ajustado com adição da solução de ácido acético 1M.

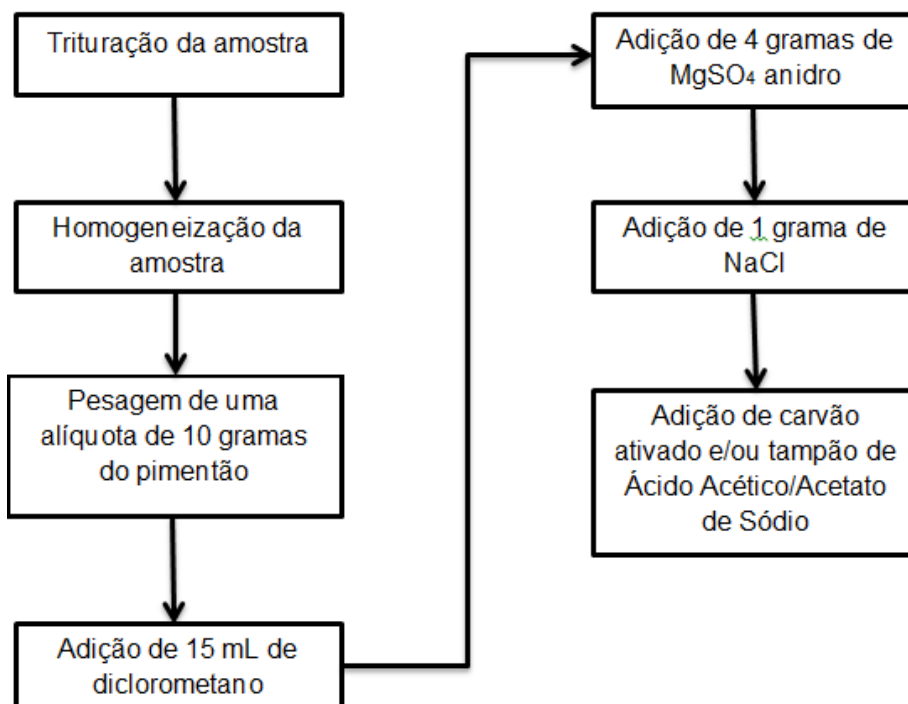
4.2.2. Preparação das amostras

Pimentões médios foram cortados com faca em pequenos pedaços e triturados em um liquidificador de copo de vidro. Na balança foram pesados 10 gramas de pimentão triturado em triplicata e colocados em um tubo de 50 mL.

Após a pesagem da amostra, foi medido na capela 15 mL de diclorometano e adicionado em cada uma das amostras. Essa adição foi seguida de agitação por 30 segundos. Em seguida, foram adicionados a essa mistura 4 gramas de sulfato de magnésio anidro em conjunto com 1 grama de cloreto de sódio. Em algumas amostras foram adicionadas 0,1 grama de carvão ativado, 5 mL de solução tampão

ácido acético/acetato de sódio de pH 5,5 e algumas foram fortificadas com solução padrão de carbamatos. A figura 13 representa um fluxograma simplificado da preparação das amostras.

Figura 13 Fluxograma de preparação das amostras



Fonte: Elaborado pela autora

Após todas as devidas adições as amostras foram levadas a centrífuga por 10 minutos à 3000 rpm e uma temperatura de 25 °C. Após a centrifugação foi feita a retirada do sobrenadante para posterior extração.

Para avaliar a eficiência da extração e, associado ao fluxograma acima a tabela 01 mostra como foram separados os tipos de amostras com base em cada parâmetro analisado.

Tabela 5 Parâmetros utilizados para avaliar a presença de carbamatos nas amostras

Código da Amostra	Presença de Carvão Ativado	Presença de Tampão	Amostra fortificada
A	Sim	Sim	Não
B	Sim	Sim	Sim
C	Sim	Não	Não
D	Sim	Não	Sim
E	Não	Sim	Não
F	Não	Sim	Sim
G	Não	Não	Não
H	Não	Não	Sim

Fonte: Elaborada pela autora

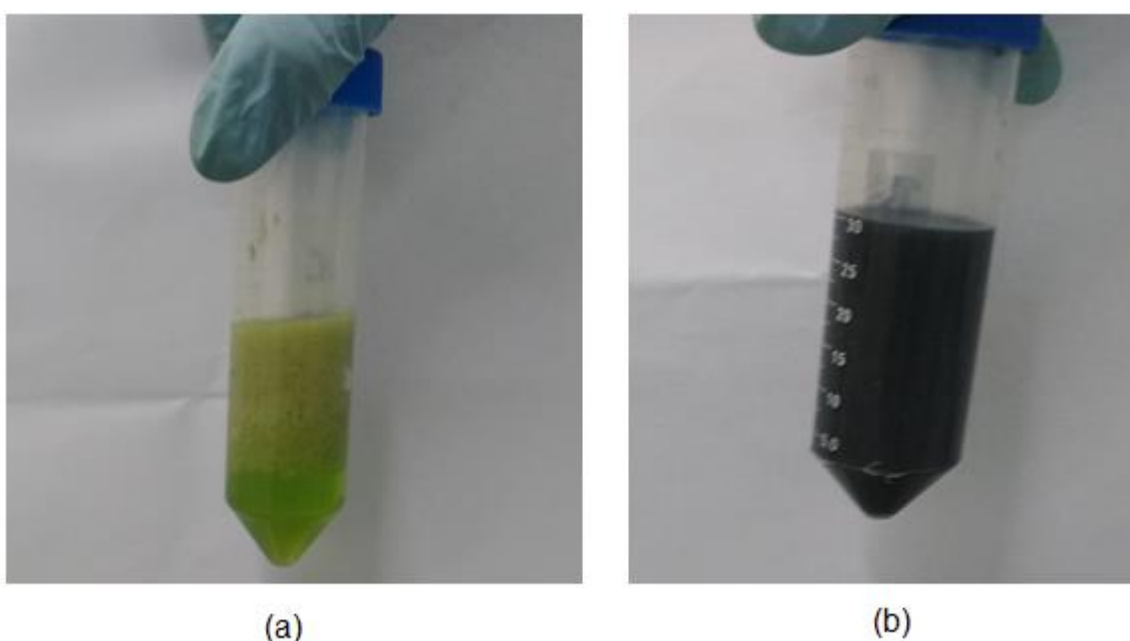
4.3. PROCEDIMENTOS PARA EXTRAÇÃO

Inicia-se a extração com a lavagem do cartucho. Para lavagem são passados primeiro 3 mL de metanol e, depois 3 mL de água ultrapura. Após isso é feita a passagem da amostra pelo cartucho. Em seguida é passado no cartucho 2 mL de solução 10% acetonitrila/água. Por último são colocados os tubos para arraste do analito por meio da passagem de 3 mL de metanol pelos cartucho.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como dito anteriormente, neste trabalho diversos fatores foram testados nas amostras de pimentão para avaliação de qual combinação seria a ideal para uma melhor extração. Na figura 14 encontra-se o resultado da mistura do pimentão triturado com o diclorometano, onde pode ser observada, já de início, a diferença das amostras com e sem a presença do carvão ativado, sendo este o primeiro fator avaliado.

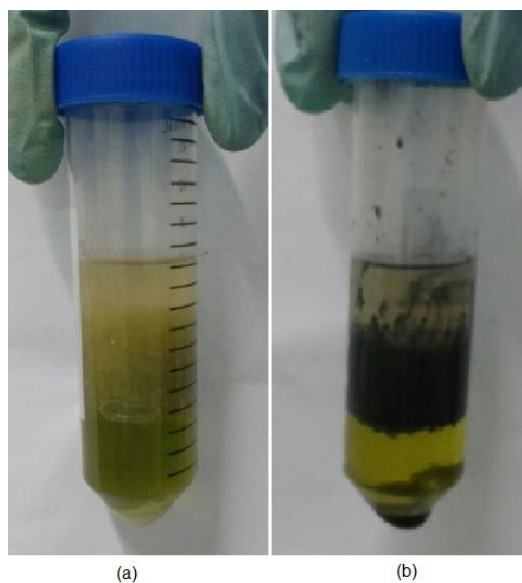
Figura 14 Amostras antes da extração (a) sem carvão ativado e (b) com carvão ativado



Fonte: A autora

A utilização do carvão ativado serve para avaliar a retirada da clorofila das amostras, para que esta não influencie na cromatografia realizada posterior a extração. Na figura 15 pode-se observar como as amostras ficaram após centrifugação, sendo a segunda amostra a que apresenta o carvão ativado. Vê-se que o sobrenadante da amostra com carvão ativado apresenta maior transparência e nitidez, mostrando assim a eficiência na retirada da clorofila da amostra.

Figura 15 Amostras após centrifugação (a) sem carvão ativado e (b) com carvão ativado



Fonte: A autora

Após a centrifugação todas as amostras passaram pela extração pelo equipamento mostrado na figura 16, sendo este acoplado a uma bomba à vácuo. A lavagem do cartucho foi realizada a vácuo, mas a passagem da amostra e posterior recuperação do analito foi realizada pela gravidade, apenas controlando a vazão para evitar a secagem do cartucho.

Figura 16 SPE

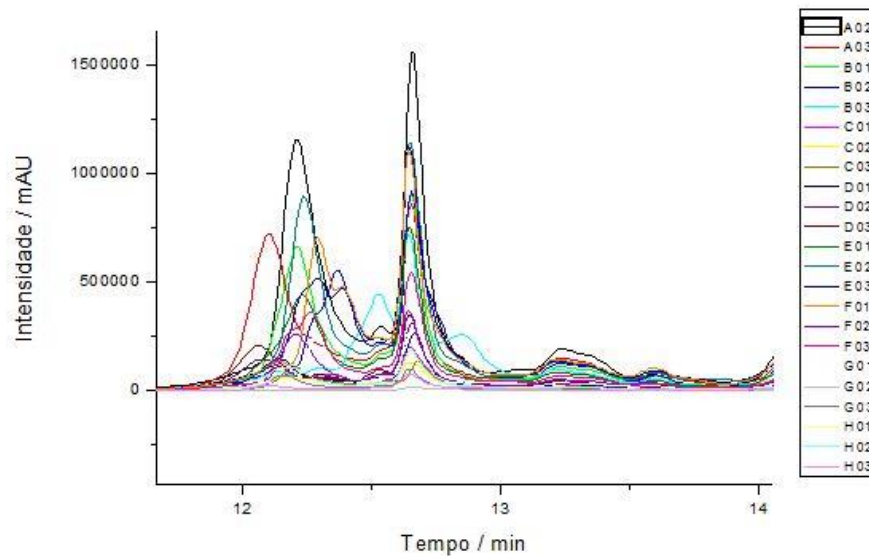


Fonte: A autora

A realização da recuperação do analito por gravidade e não à vácuo foi devido aos trabalhos publicados mostrarem que dessa forma a recuperação seria mais eficiente. O que pode ser comprovado posteriormente com o cromatograma

que une todas as amostras, mostrado na figura 17 abaixo, onde pôde ser observada a alta concentração de carbamatos por meio das intensidades de alguns picos.

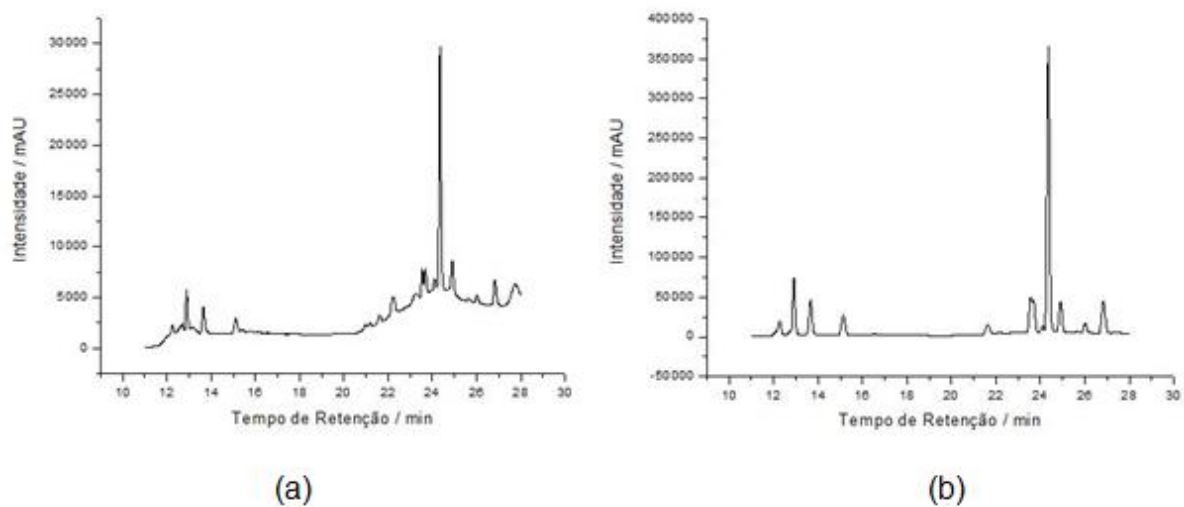
Figura 17 Cromatograma Carbamatos nas amostras de pimentão



Fonte: (OLIVEIRA, 2017)

A figura 18 apresenta cromatogramas das amostras padrões do mix dos 10 carbamatos analisados para comparação com os cromatogramas das amostras de pimentões com carvão ativado e/ou tampão.

Figura 18 Amostras padrão mix de carbamatos (a) 0.5 ppm e (b) 10 ppm



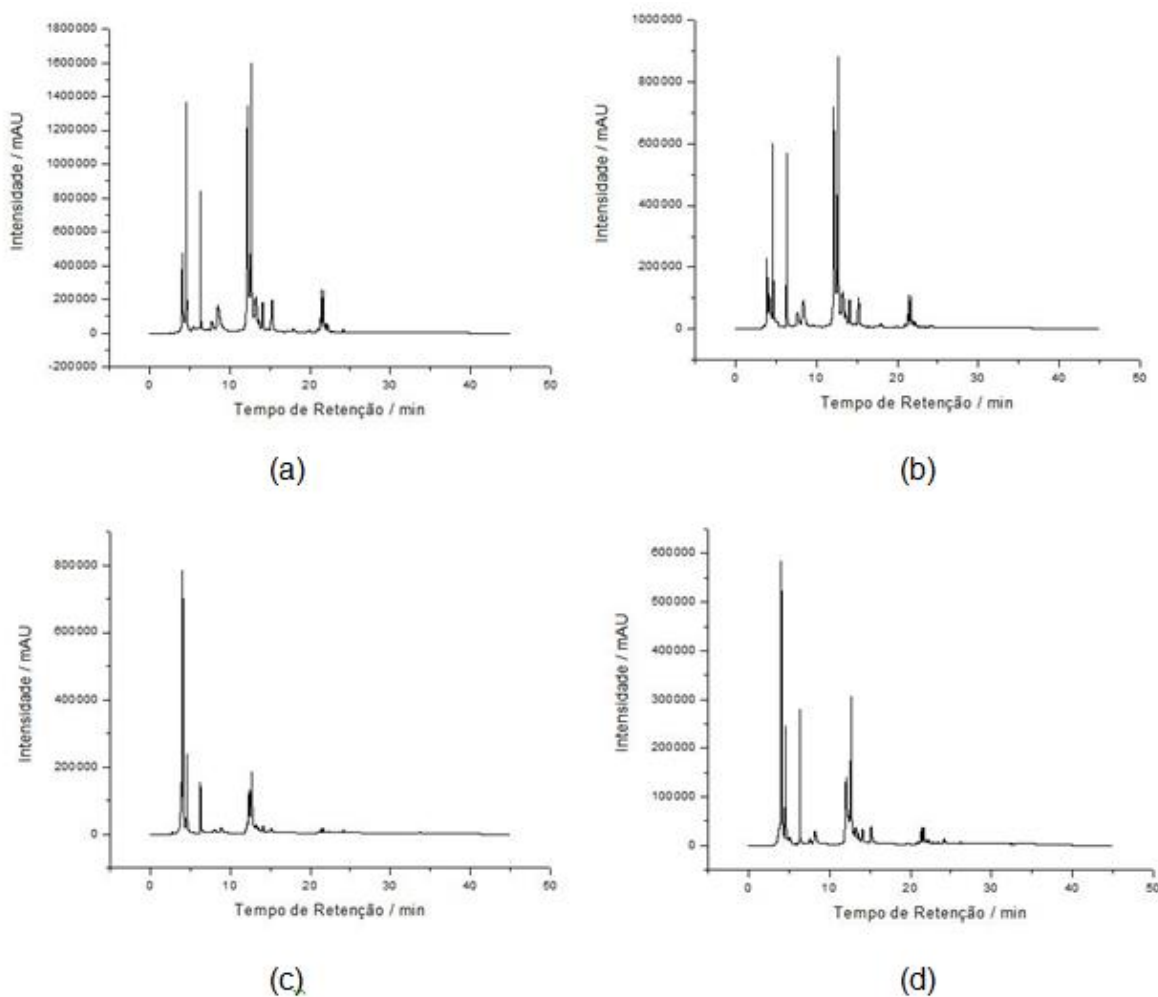
Fonte: (OLIVEIRA, 2017)

Vê-se que os picos dos carbamatos começam a aparecer a partir do tempo de retenção de aproximadamente 12 minutos. Como a concentração permitida desses

agrotóxicos é zero, em (a) foi usada um padrão de 0,5 ppm e, em (b) tem-se um padrão de 10 ppm, para que a menor das concentrações que as amostras possam apresentar sejam detectadas.

Foi possível perceber que as amostras que continham carvão ativado não apresentaram bons resultados. Pois, além de retirar a clorofila, o carvão ativado arrastou consigo os carbamatos. Não restando assim analito nas amostras. A figura 19 mostra os cromatogramas dessas amostras e, como observado, os picos mais intensos estão para tempos de retenção abaixo de 20 minutos. E, nas amostras padrões os picos mais intensos estão para tempos de retenção acima de 20 minutos. Confirmando o desaparecimento dos analitos devido a presença do carvão.

Figura 19 Amostras carvão ativado (a) com tampão (b) com tampão e fortificada (c) e (d) apenas carvão



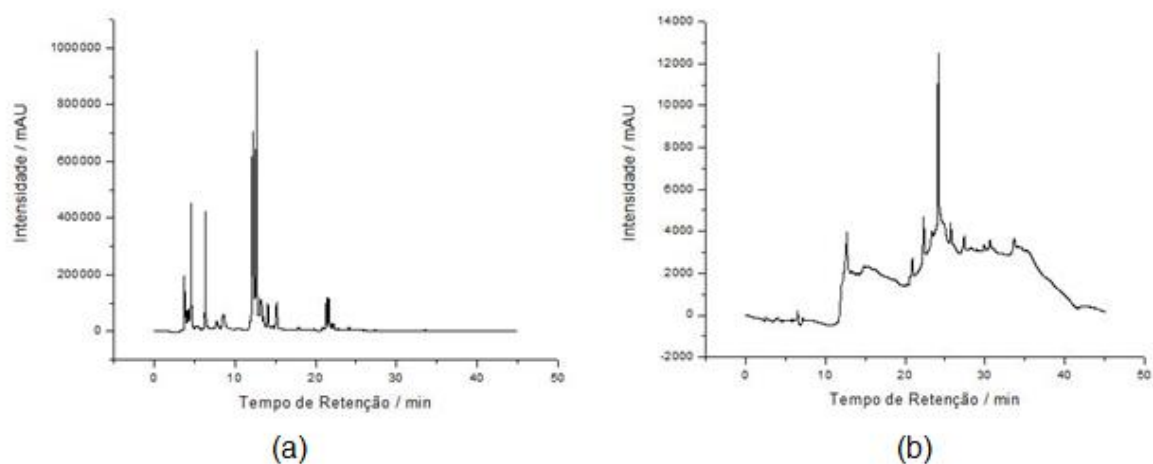
Fonte: (OLIVEIRA, 2017)

O tampão ácido acético/acetado de sódio foi utilizado para estabilização do pH nas amostra. Isso se deve a quantidade de compostos utilizados antes da extração poderem alterar o pH das amostras e, por consequência os resultados das análises.

Entretanto devido a alta instabilidade dos carbamatos e a uma concentração muito acima do esperado, apenas alguns deles puderam ser observados. Sendo eles o aldicarbe, o aldicarbe sufóxido, o metamil e o oxamil, que apresentam os menores tempos de retenção.

A figura 20-b mostra que mesmo em amostras fortificadas a instabilidades dos analitos afetam sua análise e visualização no cromatograma.

Figura 20 Amostras (a) somente tampão e (b) tampão fortificada



Fonte: (OLIVEIRA, 2017)

Foi observada uma concentração bem alta de carbamatos nas amostras, como já mostrado e comentando anteriormente na figura 17. Apesar dos carbamatos serem instáveis pode-se obter bons cromatogramas para alguns analitos, onde se observou uma alta concentração desses nas amostras. Comprovando assim que a extração foi bem executada. E, mostrando também que nenhuma das amostras analisadas se encontrava dentro dos parâmetros exigidos pelos órgãos competentes. O PARA diz que a concentração permitida dos 10 carbamatos analisados é 0 ppm. E, em algumas das amostras a concentração passou dos 100 ppm.

6. CONCLUSÕES

O processo extração proposto no presente trabalho apresentou-se eficiente para a extração de carbamatos tendo-se como matriz mostras de pimentão, conforme se pode verificar a partir dos resultados obtidos.

Conforme os parâmetros trabalhados e conforme a aplicação do planejamento experimental foi possível verificar a influência de cada um para obtenção de um melhor rendimento na recuperação.

A partir dos resultados obtidos verifica-se a ocorrência em todas as amostras dos analitos pesquisados, o que é um fator preocupante já que o material analisado apresenta uma frequência alta de consumo na alimentação dos brasileiros.

Foi comprovada uma alta concentração dos carbamatos nas amostras analisadas, apesar da instabilidade desses compostos é necessário que se fique alerta para o consumo desse alimento e também é necessário que sejam realizadas pesquisas do ponto de vista da ocorrência de doenças por eles provocadas na população exposta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, F. D. S. et al. Lixiviação de potássio em um cultivo de pimentão sob lâminas de irrigação e doses de potássio. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 24, n. 3, p. 135-144, Julho-Setembro 2011. ISSN ISSN.

CALDAS, S. S. et al. 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**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CAMARGO, P. T. D.; RODRIGUES, K. F. D. Pimentão em Cultivo Protegido: do plantio a comercialização. **Clube Amigos do Campo Gerdau**. Disponível em: <<http://www.clubeamigosdocampo.com.br/artigo/pimentao-em-cultivo-protegido-do-plantio-a-comercializacao-1210>>. Acesso em: 15 Dezembro 2016.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EduFSCar, 2001. 77 p.

FARIA, W. D. **Preparo de amostra empregando a polianilina como material adsorvente**. Universidade Federal de São João del-Rei. São João del-Rei. 2016.

FILHO, J. P. A. **Uso de Agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos**. 1ª. ed. São Paulo: Annablume: Fapesp, v. Único, 2002.

GUIDE to sample preparation. **LCGC North America Solution for separation scientists**, West Chester, Pennsylvania, 2016.

HAN, Q. et al. Application of graphene for the SPE clean-up of organophosphorus pesticides residues from apple juices. **Journal of Separation Science**, Beijing, 37, 2 Dezembro 2013. 99-105.

HORTALIÇAS, E. Hortaliças na Web: Pimentão. **Hortaliças na Web: 50 hortaliças**. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/hortalicasnaweb/pimentao.html>>. Acesso em: 16 Dezembro 2016.

INCA. **Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva acerca dos agrotóxicos**. Ministério da Saúde. [S.l.], p. 5. 2015.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, Campinas, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010. ISSN ISSN 1984-4433.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Átomo, 2009. 382 p.

LARINI, L. **Toxicologia dos Praguicidas**. 1ª. ed. São Paulo: Manole, 1999. 230 p.

LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. D. **Doenças do pimentão: diagnose e controle**. Brasília: Embrapa, 2003. 97 p.

MATHIAS, J. Pimentão: de baixa caloria e fonte de vitaminas e sais minerais, a hortaliça pode ser consumida tanto verde quanto madura. **Globo Rural**, 2015. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC1706851-4529,00.html>>. Acesso em: 2016 Dezembro 2016. Consultor Francisco Vilela Resende.

MONTEIRO, M. T. M. et al. Absorção de nutrientes por mudas de pimentão micorrizado cultivado em substrato com pó de coco. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 2, p. 95-101, Abril-Junho 2009. ISSN ISSN.

OLIVEIRA, K. C. D. **Desenvolvimento e Validação de Método Multirresíduos de Carbamatos em Pimentão**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2017.

OXAMIL 42% SCA. **Terrasei.** Disponível em: <http://www.terraia.com/agroquimicos_de_mexico/view_composition?composition_id=12857>. Acesso em: 16 Dezembro 2016.

PARA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos.** ANVISA. Brasília, p. 246. 2016.

PONTELLI, R. C. N.; NUNES, A. A.; OLIVEIRA, S. V. W. B. D. Impacto na saúde humana de disruptores endócrinos presentes em corpos hídricos: existe associação com a obesidade. **Ciências & Saúde Coletiva**, Ribeirão Preto, p. 753-766, Dezembro 2015.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, Campinas, v. 24, p. 68-76, Outubro 2000.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Capsicum:** pimentas e pimentões no Brasil. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; ALDA, M. J. L. D.; BARCELÓ, D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. **Elsevier**, v. 1152, p. 97-115, Janeiro 2007. ISSN ISSN 0021-9673.

SIQUEIRA, S. L.; KRUSE, M. H. L. Agrotóxicos e saúde humana: contribuição dos profissionais do campo da saúde. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, p. 584-590, Fevereiro 2008.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica.** Tradução da 8ª edição norte-americana. ed. São Paulo: Thomson, 2006. 871 p.

SOARES, D. F. Validação de metodologias de extração e quantificação de pesticidas diuron, clorpirifós e metil paration em águas subterrâneas em região de cultura de soja, utilizando QuEChERS/HPLC-UV. Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 2014.