

EFEITO DE MATRIZ NA QUANTIFICAÇÃO DE AGROTÓXICOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Gevany P. Pinho

Campus Rio Parnaíba, Universidade Federal de Viçosa, 38810-000 Rio Parnaíba - MG, Brasil

Antônio A. Neves* e Maria Eliana L. R. Queiroz

Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa - MG, Brasil

Flaviano O. Silvério

Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, 39404-006 Montes Claros - MG, Brasil

Recebido em 8/2/08; aceito em 2/9/08; publicado na web em 15/4/09

MATRIX EFFECT IN PESTICIDE QUANTIFICATION BY GAS CHROMATOGRAPHY. The lack of accuracy of a chromatographic method can be associated with the matrix effect. This effect is observed in pesticide quantification by gas chromatography when the chromatographic signals of standards prepared in solvents are compared with those of the analyte in extracts of complex matrices. In the competition between the matrix components and the pesticides for the active sites of the liner, a larger amount of pesticides is transferred to the column, giving apparent extractions above 100%. In this work, we discuss factors that contribute to the matrix effect and present some attempts to overcome the problem.

Keywords: matrix effect; pesticides; gas chromatography.

INTRODUÇÃO

Vários agrotóxicos são freqüentemente empregados na agricultura para controle de pragas, uma vez que contribuem para aumentar a produtividade.^{1,2} No entanto, resíduos desses compostos podem permanecer em alimentos, nos solos, na água, etc., o que é bastante prejudicial ao ser humano. Assim, é necessário seu monitoramento nas diversas matrizes ambientais, para evitar a contaminação do ser humano.³

A análise de resíduos de agrotóxicos consiste em cinco etapas básicas: extração do(s) analito(s) da matriz, remoção dos co-extrativos (limpeza), separação, identificação e quantificação do(s) composto(s).⁴ Os métodos cromatográficos são os mais empregados nas três últimas etapas da análise de agrotóxicos, sendo a cromatografia gasosa (CG) a mais utilizada para identificação e quantificação de compostos voláteis ou volatilizáveis.⁵

A cromatografia gasosa destaca-se pela disponibilidade de uma gama de detectores (captura de elétrons, fotométrico de chama, espectrometria de massas, etc.) que permitem determinar agrotóxicos e/ou seus produtos de degradação em quantidades inferiores aos limites máximos de resíduos (LMR), estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).³ Além disso, essas análises geralmente são rápidas e possibilitam quantificar um grande número de agrotóxicos simultaneamente.⁶

Nesse sentido, a exatidão e a precisão dos resultados obtidos nas análises são imprescindíveis. Qualquer fonte de erros em potencial deve ser investigada e caracterizada, como o efeito de matriz durante as análises dos agrotóxicos. Esse efeito de matriz, também conhecido como “aumento da resposta cromatográfica induzida pela matriz”, é usado para explicar as taxas de recuperação de agrotóxicos que excederem 100% e a baixa precisão de resultados.⁷ Na Tabela 1, são apresentados alguns exemplos de resultados de análises de agrotóxicos com taxas de recuperação superiores a 100%.

O efeito de matriz, além de gerar porcentagens de recuperação superiores a 100%, pode causar outras alterações na análise cromatográfica, como: i) mascaramento do pico do analito de interesse, gerando um resultado falso negativo. Isso ocorre, por exemplo, quando há perdas de quantidade do agrotóxico no sistema de injeção, fornecendo baixa

Tabela 1. Porcentagens de recuperação superiores a 100% para alguns agrotóxicos em diferentes matrizes

Agrotóxicos	Matrizes	% Rec.	Ref.
Captan	mel	1028	8
Clorotalonil	tomate	253	9
Fluvalinato	sucos	403	10
Cipermetrina	espinafre	147	11
DDT	plantas medicinais	124	12
Deltametrina	alface	133	13

resposta e dificultando a integração;¹⁰ ii) erro na identificação do analito, pois componentes da matriz podem ser erroneamente identificados como o analito de interesse quando, na verdade, este está ausente, gerando resultado falso positivo. Este problema é mais fácil de ser contornado, com a utilização de um espectrômetro de massas para monitoramento dos analitos;^{7,14} iii) aumento no sinal do detector, levando à superestimação do resultado. Isso ocorre quando impurezas voláteis são eluídas com mesmo tempo de retenção dos agrotóxicos;¹⁵ extinção do sinal no detector, ou seja, o sinal do analito é diminuído gerando uma subestimação do resultado, fato comum aos detectores fotométricos de chama.¹⁶

Embora este assunto seja bem conhecido pelos analistas que trabalham com cromatografia, ainda há uma carência de trabalhos sobre efeito de matriz na literatura, principalmente em português. Assim, este artigo tem como objetivo apresentar os principais fatores que contribuem para o efeito de matriz, bem como mostrar alternativas para eliminar ou minimizar este problema em análises de agrotóxicos por cromatografia gasosa.

ASPECTOS HISTÓRICOS

Embora os primeiros trabalhos sobre a influência da matriz nas análises de agrotóxicos por cromatografia tenham sido publicados a partir de 1981,¹⁷⁻²³ considera-se que o efeito de matriz foi sistematicamente estudado pela primeira vez por Erney *et al.*²⁴ na análise de organofosforados em leite e manteiga por CG. Esses pesquisadores observaram que compostos similares ao acefato e ao metamidofós (Fi-

*e-mail: aneves@ufv.br

gura 1), quando preparados em solvente puro, adsorvem ou degradam no sistema de injeção, em razão do estresse térmico sofrido durante a análise por cromatografia gasosa. Entretanto, quando injetados juntamente com os componentes da matriz (extratos), estes agrotóxicos apresentavam uma resposta mais alta quando comparada com as respostas de um padrão livre de componentes da matriz, ocorrendo, assim, uma superestimação dos resultados analíticos.

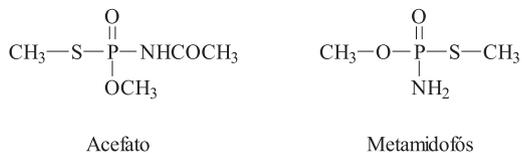


Figura 1. Estruturas dos organofosforados: acefato e metamidofós

Além disso, esses autores verificaram que melhor precisão dos resultados era obtida após injeções sucessivas da solução-padrão preparada no extrato da matriz isenta dos agrotóxicos, ou seja, só se conseguia boa repetitividade dos resultados após a saturação do sistema cromatográfico com os componentes da matriz.²⁴

Em avaliação inicial do mecanismo do efeito de matriz, Erney *et al.* verificaram que fatores como tipo de matriz, concentração do agrotóxico na amostra, tipo de injetor e temperatura do sistema cromatográfico poderiam influenciar também nos resultados.²⁴ A partir desse estudo, realizaram-se novas pesquisas para identificar os fatores que influenciavam no efeito de matriz e as possíveis medidas a serem realizadas para minimizar os problemas.

FATORES QUE INFLUENCIAM NO EFEITO DE MATRIZ

O efeito de matriz é mais pronunciado em análises de amostras complexas, como frutas,^{25,26} vegetais,^{9,14} mel,^{8,27} sucos,²⁸ vinhos,^{29,30} óleo de oliva,³¹⁻³³ tecidos animais,³⁴ leite humano,³⁵ solos,^{36,37} etc. Os problemas gerados pelos componentes endógenos da matriz nas respostas do detector não dependem apenas das características dos compostos, mas também das próprias condições cromatográficas, particularmente no injetor, na coluna cromatográfica e no detector do CG.²⁴ Por isso, é necessário conhecer os componentes do aparelho e seu funcionamento, para adotar medidas preventivas ou corretivas, na tentativa de obter resultados confiáveis.

Injetor

A técnica de injeção a quente (com ou sem divisor de fluxo), em que a amostra é vaporizada no injetor, representa uma das estratégias mais empregadas para introduzir a amostra de resíduos de agrotóxicos no CG.^{15, 38-40} Isso se deve à facilidade de introdução da amostra no aparelho, ao uso de pequenos volumes de amostra e à possibilidade de análise de agrotóxicos em nível de traços.⁴⁰ Esta técnica, em que a introdução da amostra no aparelho é acompanhada pela sua vaporização, é a mais susceptível ao efeito de matriz. A amostra é exposta no injetor a uma temperatura alta e com tempo de residência suficiente para que sítios ativos do insertor (*liner* ou tubo de vidro) do injetor adsorvam ou induzam à degradação térmica de alguns analitos, antes de serem transferidos para a coluna.²⁴

Quando as soluções-padrão são preparadas em solvente puro e analisadas por cromatografia gasosa, os sítios ativos do insertor estão disponíveis para a retenção dos analitos e, assim, menor quantidade é transferida para a coluna e conseqüentemente detectada (Figura 2A). Na análise do extrato da matriz contendo esses analitos, ocorre uma competição entre os componentes da matriz e os analitos pelos sítios ativos do insertor. À primeira vista, esse fenômeno é interessante,

pois o insertor faz “uma limpeza” da amostra (*clean up*), impedindo que maior quantidade de impurezas seja transferida para a coluna cromatográfica, aumentando seu tempo de vida útil. Essa competição entre os compostos pelos sítios ativos possibilita que maior quantidade de agrotóxico esteja disponível para ser introduzida na coluna cromatográfica e ser, conseqüentemente, detectada (Figura 2B).⁴¹ Quando a resposta do detector, atribuída ao analito, é comparada com a resposta de soluções-padrão do mesmo analito, ocorre uma superestimação dos resultados.

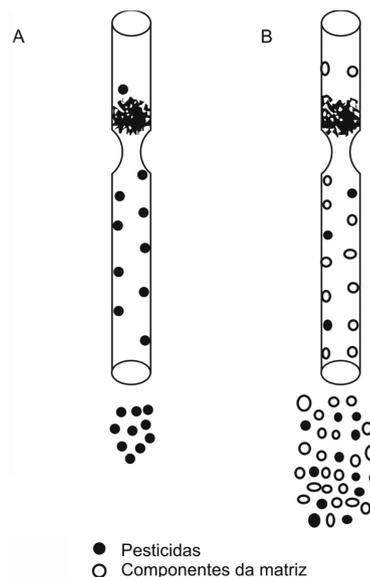


Figura 2. Possíveis adsorções que ocorrem na superfície do vidro e lã de vidro do insertor em uma injeção com divisão do fluxo (*split*): A) Agrotóxicos preparados em solvente puro. B) Agrotóxicos preparados em extratos da matriz (branco)

Os sítios ativos são formados por grupos silanóis livres e metais potencialmente presentes na superfície do insertor (tubo de vidro). Mesmo os insertores de alta qualidade classificados como “desativados” possuem estas características. Além disso, sítios ativos adicionais podem surgir a partir de co-extrativos não voláteis que se depositam na entrada do sistema cromatográfico durante repetidas análises.¹⁵ Por isso, as respostas do detector não são constantes e são afetadas pelo uso histórico do injetor. Cada injeção anterior tem potencial de modificar a atividade do injetor pela própria deposição dos componentes da matriz no insertor. Desta forma, é natural que resultados diferentes sejam obtidos quando as análises são realizadas em diferentes laboratórios e sob diferentes condições cromatográficas.^{40,42}

Mudanças na temperatura do injetor podem também afetar diferentemente o efeito de matriz. Em temperaturas mais altas, pode-se reduzir a adsorção tanto dos analitos como dos extrativos na superfície do insertor. Em contrapartida, acelera também a decomposição de compostos termicamente lábeis.^{24,40}

Coluna cromatográfica e detector

Embora existam poucos estudos na literatura sobre o efeito de matriz associado à coluna cromatográfica e ao tipo de detector, sabe-se que as conexões entre o injetor e a coluna, e as conexões entre coluna e detector podem também promover o efeito de matriz.⁴⁰

Quando uma nova coluna capilar é colocada no sistema cromatográfico, inicialmente pouco ou nenhum efeito de matriz é observado. Entretanto, o efeito de matriz nas análises aparece após algumas semanas de uso, em razão das sucessivas injeções e da conseqüente

contaminação do sistema cromatográfico.⁴¹ Segundo Grob e Grob,⁴³ a temperatura de eluição de substâncias polares diminui com o decréscimo da polaridade da coluna cromatográfica, confirmando o efeito da adsorção dos analitos. Além disso, o diâmetro interno da coluna cromatográfica tem influência na magnitude do efeito de matriz em uma análise. Geralmente, colunas de maior diâmetro interno apresentam maiores distorções dos resultados em relação às de menores diâmetros.³⁹

O efeito matriz é mais perceptível em análises pelo espectrômetro de massas que naquelas que usam detector fotométrico de chama, em função da detectabilidade (Tabela 2). Segundo Schenck e Lehotay,⁴¹ a distinção dos resultados dos dois sistemas cromatográficos pode ser atribuída aos diferentes tipos de insertores utilizados e ao pequeno diâmetro da coluna utilizada no cromatógrafo a gás, acoplado ao espectrômetro de massas. O próprio espectrômetro de massas contribui para acentuar o efeito de matriz, devido à superfície metálica do detector e por não sofrer nenhuma combustão.

Tabela 2. Aumento da resposta cromatográfica (padrão em extratos da matriz/padrão preparado em solvente puro x 100) na análise de agrotóxicos sulfurados em extratos de vagens utilizando os detectores fotométrico de chama (DFC) e espectrômetro de massas (EM). Adaptada da ref. 41

Agrotóxicos	Detectores	Respostas relativas (%)
Fosmete	EM	640
	DFC	149
Malaoxon	EM	200
	DFC	118
Dicrotofós	EM	170
	DFC	129
Paraoxon	EM	144
	DFC	114
Carbofenotion sulfona	EM	150
	DFC	121

Comparando-se o efeito de matriz associado aos detectores, foram obtidos resultados mais exatos utilizando detector nitrogênio-fósforo (DNF) em relação ao detector por captura de elétrons (DCE) (Tabela 3).⁷ Essa diferença foi atribuída às maiores concentrações dos analitos usadas nas análises por CG-DNF, uma vez que o limite de detecção deste detector foi maior para alguns analitos. Nessa condição, a interferência dos componentes torna-se menos significativa nos resultados, gerando menor efeito de matriz.

Propriedades dos agrotóxicos

Compostos que não são afetados pelo efeito de matriz são considerados termicamente estáveis, apresentam um limitado potencial de adsorção no injetor em temperaturas elevadas e a matriz é incapaz de providenciar um efeito protetor significativo.⁴⁰

As taxas de recuperação aparentemente mais altas e com baixa precisão são observadas em análises de agrotóxicos mais polares, sendo o grau de polaridade classificado de acordo com a solubilidade em água ou K_{ow} (coeficiente de partição octanol/água).⁴⁴ Compostos contendo grupamentos -P=O (organofosforados), -O-CO-NH- (carbamatos), -OH (hidroxilados), -N= (imidazoles e benzimidazoles), -NH-CO-NH- (derivados da uréia) são mais susceptíveis ao efeito de matriz.⁷

Schenck e Lehotay⁴¹ estudaram um grupo de organofosforados que apresentavam, em suas estruturas, ligações P=O e P=S. Dentre

Tabela 3. Resposta relativa (100% = resposta correspondente ao padrão preparado em solvente puro) utilizando DCE na quantificação de agrotóxicos em extratos de laranja, na faixa de concentração 0,011-0,101 mg kg⁻¹ e o DNF na quantificação de agrotóxicos em extratos de laranja, na faixa de concentração 0,0176-0,382 mg kg⁻¹. Adaptada da ref. 7

Agrotóxicos	DCE		DNF	
	% Recuperação	Agrotóxicos	% Recuperação	Agrotóxicos
Bromopropilato	135	Diazinon	102	
λ-cialotrina	131	Diclorvós	104	
Cipermetrina	112	Etion	104	
Diclofluanide	131	Fenitroton	102	
α-Endossulfam	105	Clorprofam	103	
Endossulfam-sulfato	138	Clorpirifós	106	
Fenvalerato	105	Clorpirifós-metil	103	
Clorotalonil	224	Imalazil	45	
Iprodione	114	Metalaxil	101	
Lindane	103	Metamidofós	74	
Permetrina	110	Paration	107	
Procimidone	134	Pirimicarb	82	
Tolilfluanida	122	Pirimifós-metil	104	

eles, havia aqueles cujas análises não apresentavam efeito de matriz significativo, como o paration e malation (Figura 3A) e outros que tinham elevado aumento das respostas, como paraoxon e malaoxon (Figura 3B). Apesar da semelhança entre as estruturas químicas, observaram que compostos mais polares e que continham ligações P=O exibiam maior efeito de matriz.

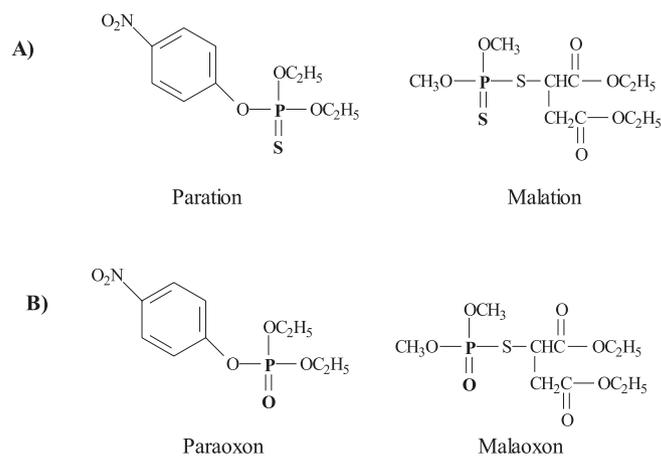


Figura 3. Estruturas químicas de agrotóxicos organofosforados: A) agrotóxicos em que o efeito de matriz é pouco pronunciado, B) agrotóxicos que são susceptíveis ao efeito de matriz

Os piretróides, apesar de serem menos polares, apresentam efeito de matriz significativo. Neste caso, a elevada massa molar dos agrotóxicos (acima de 400 g mol⁻¹) dificulta a volatilização e menor quantidade de analito é introduzida na coluna cromatográfica quando preparado em solvente puro, produzindo menores respostas.¹⁰

Compostos hidrofóbicos, porém, como os agrotóxicos organoclorados, não apresentam efeito de matriz pronunciado. Estes compostos

são menos susceptíveis à adsorção pelos sítios ativos do insertor. Uma exceção é o DDT, que pode ser termicamente degradado no injetor após acúmulo de co-extrativos.¹⁰

Outra característica de alguns agrotóxicos é a susceptibilidade de sofrer degradação térmica quando analisados em solvente puro. Nesta condição, sinais destes compostos são apenas detectados. Entretanto, na presença dos componentes da matriz, torna-se possível a integração dos picos para a quantificação.

Propriedades da matriz

A intensidade do efeito de matriz para dado agrotóxico é influenciada pela natureza da amostra e pelo tipo de co-extrativos (tamanho das moléculas, polaridade, estabilidade térmica, volatilidade, etc.). Um exemplo que ilustra isso é a análise de agrotóxicos em laranja, pois o alto conteúdo de óleos essenciais da matriz interfere significativamente na quantificação dos analitos.⁷ Co-extrativos como lipídios (triacilgliceróis, fosfolipídios, etc.), alguns pigmentos (clorofila, carotenóides, etc.) e outros componentes de massa molar elevada (resina de plantas) também podem permanecer solubilizados nos extratos, mesmo após a purificação da amostra, promovendo o efeito de matriz nas análises cromatográficas.¹⁵

A influência da natureza da matriz foi observada também nas análises de organofosforados utilizando o modo de injeção sem divisor de fluxo. Esses compostos sofrem maior efeito de matriz quando analisados em extratos obtidos da manteiga do que obtidos de leite (Tabela 4).²⁴ Outro exemplo é o agrotóxico pirimicarbe cuja análise sofre um efeito de matriz similar em amostras de tomate e pimenta (taxa de recuperação 114 e 117%, respectivamente). No entanto, a análise desse composto em amostras de pepino não apresenta efeito de matriz (87%). Já na análise do clorotalonil observa-se efeito de matriz completamente diferente para as três matrizes, sendo o mais crítico o do tomate, em que foi encontrada taxa de recuperação superior a 250%.⁹

Tabela 4. Efeito de matriz observado em análises de agrotóxicos organofosforados em extratos de leite e manteiga usando a injeção sem divisor de fluxo para introdução da amostra no CG. Adaptada da ref. 24

Agrotóxicos	Resposta do agrotóxico em extrato da matriz/ resposta do agrotóxico em solvente puro	
	Extratos de leite	Extratos de manteiga
	Acefato	1,14
Ometoato	1,07	1,33
Diazinon	1,00	1,25
Dimetoato	1,06	1,31
Clorpirifós	1,04	1,07

Concentração dos agrotóxicos

O efeito de matriz é mais significativo na análise de agrotóxicos quando estes se encontram em concentrações mais baixas ou quando a proporção de componentes da matriz/analito é muito alta.⁷ Nessa situação, quando injetada a solução-padrão dos agrotóxicos preparados em solvente puro, em baixa concentração, uma quantidade expressiva do analito é retida na interface do insertor. Conseqüentemente, pequena quantidade de analito é detectada. Quando se analisam os extratos, apenas uma quantidade insignificante do analito é adsorvida, porque a proporção de componentes da matriz/analito é muito alta e os interferentes são preferencialmente adsorvidos. Este fato faz com que o efeito de matriz seja maior para os extratos em que o analito está

em menores concentrações, como pode ser verificado pela maioria dos resultados contidos na Tabela 5. Entretanto, há exceções, como iprodione e paration-metil.

Tabela 5. Porcentagem de recuperação de agrotóxicos obtidos utilizando curva analítica preparada em solvente puro para amostras de tomate em diferentes concentrações. Adaptada da ref. 9

Agrotóxicos	Concentrações	
	< 0,02 mg kg ⁻¹	> 0,21 mg kg ⁻¹
	Porcentagem de recuperação	
Clorotalonil	253	230
Vinclozolina	150	112
Captan	245	146
Procimidone	196	150
α -Endossulfam	150	115
Bifentrina	135	82
Cis-permetrina	256	103
trans-permetrina	206	130
Fluvalinato-I	135	113
Fluvalinato-II	238	121
Deltametrina	320	171
Iprodione	176	185
Paration	97	85
Paration-metil	97	105
Clorpirifós	111	102
Pirimicarb	114	106
Metamidofós	152	98

Alguns compostos não apresentam nenhum efeito de matriz em altas concentrações. Entretanto, podem apresentar um efeito de matriz pronunciado quando analisada menor proporção do agrotóxico na matriz, como foi observado, por exemplo, na análise de terbufós e pirazofós em frutas e vegetais.⁴¹

Esses são os principais fatores que contribuem para o efeito de matriz em análises de agrotóxicos por cromatografia gasosa.

MÉTODOS PARA MINIMIZAR O EFEITO DE MATRIZ

A quantificação exata de resíduos de agrotóxicos em amostras ambientais é importante, sendo necessário o desenvolvimento de métodos para contornar o problema da alta recuperação de determinados agrotóxicos. Embora já existam na literatura vários métodos, nenhum deles pode ser considerado universal, ou seja, não é capaz de eliminar totalmente o efeito de matriz na quantificação de qualquer agrotóxico nos diversos tipos de matrizes. A escolha do método adequado para minimizar os erros depende do conjunto de agrotóxicos que se deseja analisar, do método analítico, das condições do equipamento, da disponibilidade de tempo e de recursos, etc. As propostas a seguir são as mais comuns de serem encontradas em trabalhos científicos e em laboratórios oficiais para monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

Curva analítica da matriz

Uma estratégia aparentemente adequada para contornar o problema criado pela presença dos sítios ativos no injetor é o mascaramento

intencional desses sítios (grupos silanóis livres, metais, etc.). Nesta técnica, as soluções-padrão são preparadas em extratos da matriz, livres de resíduos de agrotóxicos (branco) e analisadas por CG. Dessa forma, os próprios componentes da matriz ocupam os sítios ativos durante a análise do padrão, assim como ocorre nas análises dos extratos.^{9,45} Essa é uma metodologia muito utilizada nas análises interlaboratoriais de agrotóxicos, a fim de minimizar a diferença entre os resultados associada ao efeito de matriz. Na Tabela 6 é possível observar essa diferença na quantificação de agrotóxicos por CG-EM, quando se utiliza solução-padrão preparada em solvente puro e em extratos de amostras de batata fortificados. Para a maioria dos agrotóxicos, foram obtidas porcentagens de extração superiores a 100% quando a curva analítica preparada com solvente puro foi utilizada para quantificação.

Tabela 6. Quantificação de agrotóxicos em batata por CG-EM, utilizando solução-padrão dos agrotóxicos preparada em solvente puro e em extratos de batata (branco). Adaptada da ref. 25

Agrotóxicos	Porcentagem de recuperação (%)	
	Curva Analítica	
	Solvente puro	Extrato de batata
Mevinfós	161	88
Clorprofam	145	97
Diazinon	90	91
Dissulfoton	81	85
Dimetoato	239	94
Vinclozolin	110	86
Clorpirifós	145	90
Carbaril	277	81
Malation	169	85
Captan	207	38
Iprodione	230	94

Para análise de rotina de agrotóxicos em diferentes matrizes, o preparo dos padrões nos próprios extratos requer muito tempo. Para tais análises, seria mais viável utilizar uma matriz representativa de diversos tipos. Hill e Reynolds⁴⁶ sugeriram que essa amostra deveria ser selecionada baseando-se em sua composição (teor de água, açúcar, conteúdos ácidos, lipídios, etc.). Já Vidal *et al.*⁴⁷ relatam que a matriz de referência deveria ser escolhida comparando-se as inclinações das curvas analíticas, obtidas a partir de soluções-padrão de agrotóxicos preparadas em diversas matrizes. Por exemplo, amostras de pepino poderiam ser usadas como amostra de referência para vegetais, como o próprio pepino, a pimenta, a abóbora e a berinjela; a melancia como referência para frutas como a própria melancia e o melão. Outro critério proposto seria selecionar amostras de referências baseado em sua composição: cenoura representando os alimentos que são raízes; morango representando as amostras com alto teor de açúcar; alface representando matriz com alto teor de clorofila, etc.⁴⁸

Essas estratégias, entretanto, não são recomendadas para as metodologias oficiais de análises de resíduos de agrotóxicos, por apresentarem algumas limitações, como: estabilidade limitada de alguns agrotóxicos quando estocados por longo tempo na presença dos componentes da matriz,⁴⁹ bem como a estabilidade dos próprios componentes da matriz; dificuldade de obter amostras da matriz com composições semelhantes;⁵⁰ aumento da demanda para manutenção da instrumentação, devido à excessiva contaminação do CG; aumento do custo das análises.

Formas de injeção

Vários fatores podem estar envolvidos no aumento da resposta induzido pela matriz, mas observa-se que o principal responsável é o insertor. A ação do insertor depende da temperatura de injeção, da vazão e da pressão do gás de arraste do volume de injeção, do tipo de solvente, do diâmetro da coluna e do tempo de retenção, pois todos esses fatores influenciam na interação do analito com a superfície.⁵¹

Baseado nisso, Vogt *et al.*, em 1979, propuseram uma nova técnica para a introdução da amostra no CG, denominada de temperatura programada de vaporização (TPV).^{52,53} Nessa técnica, um grande volume de amostra é introduzido no injetor em temperatura apropriada à vaporização apenas do solvente, para formar depósitos de agrotóxicos e componentes da matriz no compartimento de injeção. Posteriormente, este compartimento é aquecido em temperatura apropriada de forma a vaporizar e transferir os compostos para a coluna cromatográfica.^{54,55}

O compartimento de injeção empregado na TPV é menor que o compartimento de injeção clássico no modo sem divisor de fluxo, sendo mais facilmente aquecido ou resfriado, diminuindo o estresse térmico para os analitos lábeis. Da mesma forma, permite maior velocidade do gás de arraste, reduzindo o tempo de permanência dos compostos no insertor aquecido. Outro benefício adicional obtido é a redução da superfície de contato dos sítios ativos do insertor com o analito.³⁸ Em geral, a substituição de técnicas de injeções convencionais, como a injeção a quente no modo sem divisor de fluxo, pela TPV, diminui o efeito de matriz, mas não o elimina para todos os compostos.⁵⁶

Outra tentativa para minimizar o efeito de matriz foi o desenvolvimento de um controle de pressão eletrônico no injetor em 1990.⁵⁷ Nessa técnica, a amostra é vaporizada com uma alta vazão de gás de arraste para a coluna, para onde é carregada rapidamente, apresentando menor tempo de residência no insertor. Conseqüentemente, ocorre uma eficiente supressão da adsorção ou degradação do analito. Depois da injeção, a vazão de gás para a coluna é ajustada automaticamente para o valor otimizado, para assegurar a separação dos componentes na coluna. Essa técnica minimiza o efeito de matriz, mas ainda não o elimina definitivamente.^{58, 59}

Perdas de analitos no sistema de injeção também podem ser evitadas utilizando-se a injeção direta na coluna (*on-column*). Erney *et al.*²⁴ observaram que análise de agrotóxicos organofosforados em leite, utilizando injeção na cabeça da coluna, permite a entrada de maior quantidade de agrotóxico na coluna cromatográfica, quando comparada com a técnica de injeção de vaporização do agrotóxico no injetor. Embora ocorra uma transferência não discriminativa dos componentes da amostra no sistema CG, a injeção na cabeça da coluna ainda apresenta efeito de matriz, sendo atribuído à coluna cromatográfica e não à forma de injeção. Além disso, a injeção na cabeça da coluna requer maior frequência de manutenção, sendo uma técnica impraticável para análises de rotina em matrizes complexas.⁵¹ Zrostlíková *et al.*³⁸ verificaram que após cerca de 30 injeções de extratos de trigo na cabeça da coluna, os picos atribuídos a compostos polares como carbaril, acefato, metamidofós, etc., preparados em solvente puro, eram distorcidos ou desapareciam.

Estudos envolvendo outros modos de introdução da amostra na coluna capilar são encontrados na literatura. Esses estudos visam encontrar a forma de injeção que apresente menor interferência dos componentes da matriz nas análises.^{20, 60-62}

Analitos protetores

A primeira tentativa de mascarar os sítios ativos do insertor, com o objetivo de minimizar a adsorção dos analitos de interesse, foi proposta por Erney *et al.*²⁴ Esses pesquisadores propuseram a

saturação de todo o sistema cromatográfico com o extrato da matriz para que os compostos fossem adsorvidos na interface do insertor. Assim, ao se realizarem as análises dos padrões e extratos, estas não seriam afetadas pelo efeito de matriz. Entretanto, observaram que a saturação não era permanente, pois as áreas correspondentes aos padrões de agrotóxicos variavam, gerando um grande acúmulo de material não volátil no sistema cromatográfico.²⁴ Neste mesmo ano, Erney e Poole⁶³ propuseram a adição de compostos nas soluções-padrão que apresentassem fortes interações com o sistema cromatográfico, para diminuir a adsorção ou a degradação dos agrotóxicos. Entretanto, os compostos selecionados não proporcionaram resultados satisfatórios.⁶³

Em 2003, o uso de analitos protetores foi reintroduzido. Desta vez, foram utilizados compostos ou misturas que imitavam o comportamento dos componentes da matriz. Soluções-padrão de agrotóxicos foram preparadas em solvente puro, adicionando-se baixa concentração de aditivos (analitos protetores) capazes de interagir fortemente com a interface, como através de ligações de hidrogênio com os grupos silanóis do insertor. Esses analitos protetores devem ter volatilidade similar à dos agrotóxicos, impedindo a adsorção destes durante a análise da solução-padrão, assim como ocorre nos extratos.⁵¹ Uma substância é considerada um bom analito protetor se a sua eficiência for independente da natureza da matriz, for solúvel no solvente da solução-padrão, não reagir com os agrotóxicos de interesse, não se acumular no sistema cromatográfico e não apresentar o mesmo tempo de retenção dos analitos. Esses compostos devem apresentar grupos polares, como hidroxilas, carboxilas, grupos nitrogenados, etc., para que, ao competirem com os agrotóxicos, sejam predominantemente adsorvidos no insertor, liberando o analito para a coluna cromatográfica. Baseados nessas informações, Anastassiades e colaboradores⁵¹ avaliaram 93 compostos como analitos protetores para análise de 30 agrotóxicos. Os analitos protetores selecionados eram açúcares e seus derivados (poliidroxilados), ácidos carboxílicos, aminoácidos, compostos alifáticos como o dodecano, compostos básicos como a uréia, etc.⁵¹

Os ácidos graxos de cadeias longas, presentes em azeite de oliva, também são bons exemplos de analitos protetores. Esses compostos são eficientes na análise de piretróides, pois ambos apresentam faixas de volatilização semelhantes e elevadas massas molares. Este analito protetor é adsorvido preferencialmente no insertor e somente se volatiliza após análise do piretróide. Por exemplo, na análise de fluvalinato em mel, quando se utiliza azeite de oliva (contém ácido graxo) como analito protetor, é obtida uma taxa de recuperação de 100,3% para o agrotóxico. Entretanto, quando se utiliza um analito protetor ineficiente, como *L*-glucono- δ -lactona, obtém-se uma recuperação de 521,1%.¹⁰ Este mesmo composto ainda pode ser utilizado como protetor para vários outros agrotóxicos. O *L*-glucono- δ -lactona e também o sorbitol se degradam no injetor, formando vários compostos com temperatura de volatilização distinta, com vários tempos de retenção na análise cromatográfica. Já para agrotóxicos voláteis, é conveniente utilizar analitos como o 3-etoxipropano-1,2-diol como protetor.⁶⁴

Para uma análise de multirresíduos de agrotóxicos, com diferentes temperaturas de volatilização, pode ser utilizada uma mistura de agentes protetores, como a mistura dos três compostos citados anteriormente (*L*-glucono- δ -lactona, sorbitol e 3-etoxipropano-1,2-diol),^{64,65} ou ainda açúcares, como glicose, frutose e xilose.^{51,66}

A principal limitação desta técnica é que os melhores analitos protetores são muito polares, sendo necessária a utilização de solventes, como acetonitrila ou água, para preparar as soluções-padrão, o que limita sua utilização para análises de agrotóxicos apolares por cromatografia gasosa.

Limpeza dos extratos

Após a extração de agrotóxicos da amostra, uma etapa adicional pode ser realizada para separar satisfatoriamente os analitos de co-extrativos remanescentes, denominado limpeza dos extratos. Comumente, são empregados procedimentos como cromatografia de permeação em gel,⁶⁷ cromatografia por adsorção,^{8,68} cartuchos de extração em fase sólida empregando vários tipos de adsorventes (sílica, C-18, carvão ativado, alumina, florisil, C-8, etc.),^{9,69-72} dispersão da matriz em fase sólida (DMFS)^{73,74} e, mais recentemente, a extração com partição em baixa temperatura.^{33,75-77} As duas últimas técnicas consideram a extração e a limpeza realizadas simultaneamente.

Embora o processo de limpeza dos extratos possa resultar em perda de alguns compostos, bem como aumentar o tempo e o custo das análises, esta etapa representa a alternativa mais recomendada para reduzir o efeito de matriz, por causar menos danos ao sistema cromatográfico.⁷

Schenck e Lehotay⁴¹ observaram que a utilização de carvão ativado na etapa de limpeza resultou na total remoção de pigmentos de extratos de frutas e vegetais. Entretanto, os resultados mostraram que os pigmentos não eram os principais responsáveis pelo efeito de matriz. Ao combinar carvão ativado com cartuchos de extração em fase sólida (adsorventes trocadores de íons e com grupos aminos), além da eliminação dos pigmentos, havia também redução significativa do efeito de matriz (Tabela 7).

Tabela 7. Aumento da resposta cromatográfica (solução-padrão preparada em extratos da matriz/solução-padrão preparada em solvente x 100) na recuperação de agrotóxicos, usando CG-DFC na análise de extratos de maçã, com o uso do método oficial de extração, seguido por limpeza com EFS para agrotóxicos (0,070-0,600 mg kg⁻¹). Adaptado da ref. 41

Agrotóxicos	Recuperação média (%)		
	Nenhuma limpeza	Carvão ativado	Adsorventes combinados*
Ometoato	145	141	108
Monocrotófos	143	145	108
Malaoxon	132	126	100
Dimetoato	130	126	107
Fosmete	129	120	92
Acefato	122	125	104

* Combinação de adsorventes: carvão ativado + trocador de ânion forte + adsorvente com grupamento amino.

A dificuldade de realizar limpeza adequada dos extratos pode ser observada pelos resultados encontrados por Pinho.^{77,78} Na análise de agrotóxicos empregando a extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT), verificou-se que a limpeza com carvão ativado, além de remover os interferentes em análises de extratos de amostras de tomate (confirmados por espectrofotometria), também diminui a porcentagem de extração dos agrotóxicos na análise por CG-DCE (Figuras 4 e 5).⁷⁷

Função de correção

A porcentagem de extração dos analitos pode ser determinada com maior exatidão fazendo-se uma correção nos resultados obtidos após análise cromatográfica. Este procedimento significa desconsiderar o aumento da resposta devido ao efeito de matriz. Para isso, duas curvas analíticas dos padrões de analitos são preparadas, sendo

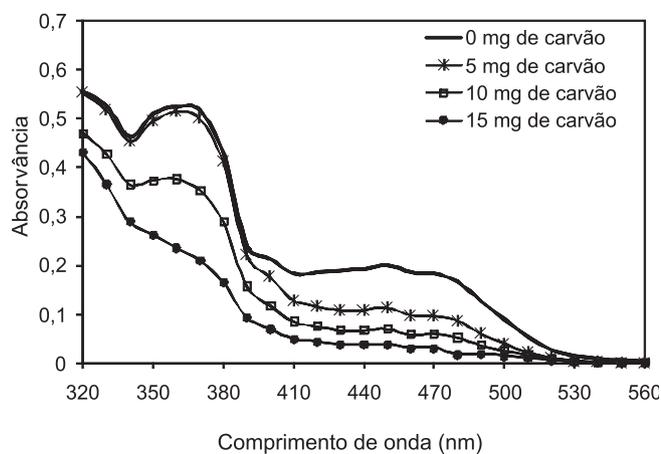


Figura 4. Espectros de absorção dos extratos obtidos a partir da ESL-PBT de amostras de tomate isentas de agrotóxicos (branco) com a adição de 0, 5, 10, 15 mg de carvão ativado

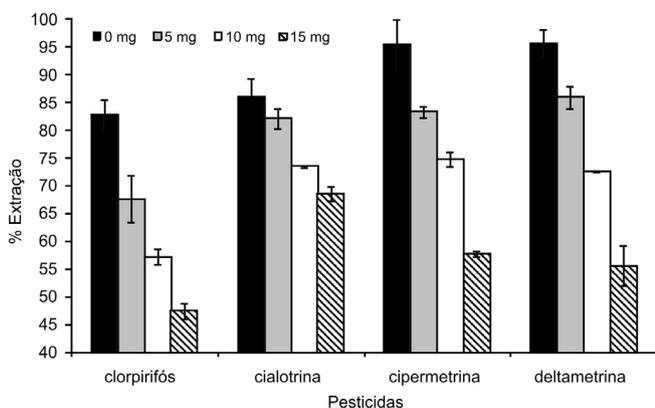


Figura 5. Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos clorpirifós, cipermetrina, λ-cialotrina e deltametrina com a adição de 0, 5, 10 e 15 mg de carvão ativado durante o processo de extração empregando a técnica ESL-PBT

uma em solvente puro e a outra no extrato da matriz, em determinada faixa de concentração. Essas soluções são analisadas várias vezes por determinado período, para verificar a repetibilidade e linearidade dos sinais cromatográficos.⁴² A partir das diferenças entre os parâmetros da regressão (coeficientes angular e linear) de ambas as curvas, uma função de correção é determinada e validada por tratamento estatístico.

A função de correção permite converter a concentração do analito na amostra, obtida a partir da curva analítica preparada em solvente puro, de forma a refletir o valor equivalente como se estivesse utilizando a curva de calibração preparada no extrato da matriz.⁷⁹⁻⁸²

Na Figura 6A, B e C estão representadas as curvas analíticas de análises cromatográficas de deltametrina em tomate,⁷⁷ thiametoxan em solo e batata.⁸³ Em cada gráfico, as curvas analíticas dos agrotóxicos foram obtidas em solventes puros e em extratos das matrizes.

A equação obtida por linearização dos dados, para as soluções-padrão preparadas em solvente puro, pode ser expressa como $Y = a_{ps} X_{ps} + b_{ps}$ (ps = padrão em solvente puro). A equação $Y = a_{pm} X_{pm} + b_{pm}$ (pm = padrão em extrato da matriz) é obtida a partir da curva analítica preparada em extrato da matriz.⁴² A relação entre as duas equações ($X_{pm} = AX_{ps} + B$) pode ser obtida igualando-as. Esta função de correção permite estimar a concentração exata do agrotóxico, após extração e análise cromatográfica, utilizando a equação em que as soluções-padrão foram preparadas em solvente puro. A constante B da função de correção representa a relação entre os coeficientes $(b_{ps} - b_{pm})/a_{pm}$ e a constante A representa a razão entre os coeficientes angulares originais a_{ps}/a_{pm} .⁸⁰

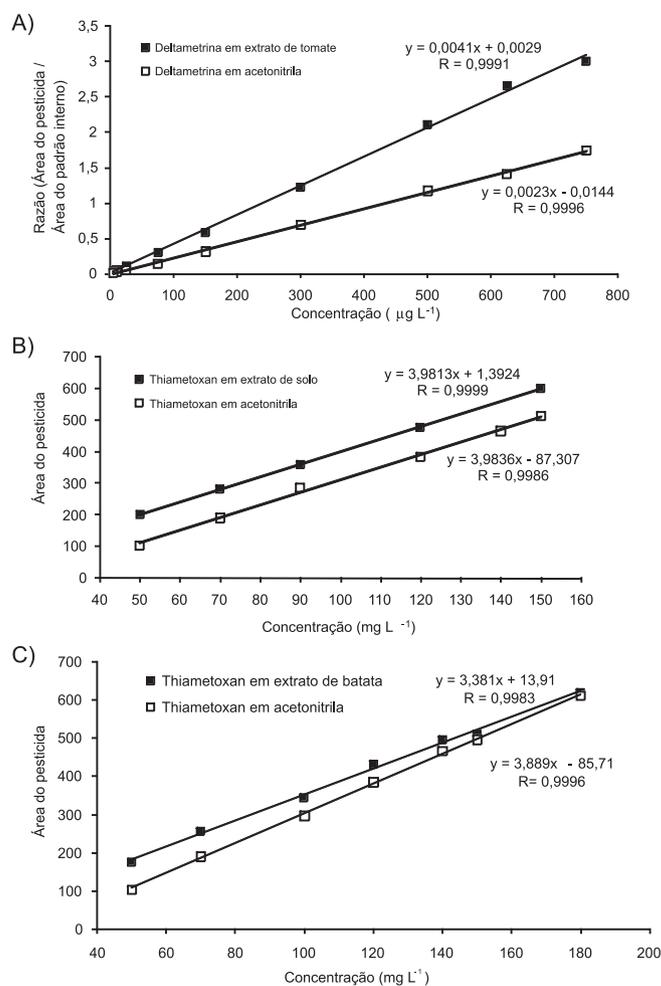


Figura 6. (A) Curvas analíticas preparadas em acetoneitrila e em extratos de tomate para a deltametrina; (B) curvas analíticas preparadas em acetoneitrila e em extratos de solo para o thiametoxan; (C) curvas analíticas preparadas em acetoneitrila e em extratos de batata para o thiametoxan

Quando apenas o coeficiente angular (a) nas duas curvas analíticas para o mesmo agrotóxico é diferente, significa que os componentes da matriz introduzem um erro sistemático proporcional e a função de correção pode ser expressa como $X_{pm} = AX_{ps}$ (Figura 6A). Quando apenas o coeficiente linear (b) difere, quando se comparan as duas curvas, significa que houve um erro sistemático constante, e a função de correção pode ser expressa como $X_{pm} = X_{ps} + B$ (Figura 6B). Ambos os erros podem ocorrer também quando os dois coeficientes são distintos para as duas curvas ($X_{pm} = AX_{ps} + B$) (Figura 6C).^{81, 84}

A relação entre essas curvas analíticas pode ser usada continuamente caso não haja mudança estatisticamente significativa nos coeficientes angulares e lineares. A principal vantagem deste método é a redução do custo da análise e do tempo necessário para preparar a curva analítica no extrato da matriz de cada análise, além de diminuir a frequência de manutenção do CG devido à menor introdução dos componentes da matriz no aparelho.

A aplicação da função de correção, entretanto, limita-se à quantificação de agrotóxicos, variando somente numa estreita faixa de concentração, pois a extensão do efeito de matriz depende da razão das concentrações do analito e componentes da matriz.^{80, 81} Além disso, a função de correção é dependente da estabilidade do agrotóxico em todo o procedimento analítico, por exemplo, o uso de um sistema CG diferente já conduz a resultados variados.

Método de adição de padrão

Esta ferramenta também pode ser utilizada para corrigir a influência dos componentes da matriz na quantificação exata de agrotóxico numa amostra individual. A amostra contendo o agrotóxico de interesse é submetida a um processo de extração, e o extrato obtido é dividido em uma série de subamostras. Quantidades diferentes e conhecidas de padrões do agrotóxico são adicionadas em cada subamostra, que são aferidas para o mesmo volume, e analisadas nas mesmas condições cromatográficas. A concentração do agrotóxico é determinada por regressão linear.²⁵

As desvantagens deste método é que, para cada amostra, é necessário construir uma curva analítica. Logo, restringe-se a análise a pequeno número de amostras. Além disso, pode conduzir a resultados errôneos, porque considera que o efeito de matriz é independente da concentração do analito. Esta técnica proporciona maior contaminação do sistema cromatográfico, necessitando de manutenção com maior frequência, por isso observa-se na literatura a escassez de trabalhos utilizando-a.

CONCLUSÃO

Em termos gerais, a exatidão e precisão dos resultados das análises de traços de agrotóxicos por cromatografia gasosa são afetadas pelo efeito de matriz; principalmente, quando se utilizam soluções-padrão de agrotóxicos preparadas em solvente puro para a quantificação destes em matrizes de natureza complexa. É necessário conhecer as propriedades dos agrotóxicos analisados (volatilidade, estabilidade térmica, polaridade, etc.), bem como os principais componentes da matriz, para propor uma metodologia de prevenção (limpeza, injeção na cabeça da coluna, PTV, etc.) ou mesmo compensação da ocorrência de efeito de matriz (analitos protetores, função de correção, adição de padrão, etc.). Entre os diversos métodos propostos para minimizar o efeito de matriz, o mais comum é o uso de soluções-padrão preparadas no próprio extrato da matriz, enquanto o uso de analitos protetores tem se mostrado muito promissor nesta área.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Coutinho, C. F. B.; Tanimoto, S. T.; Galli, A.; Garbellini, G. S.; Takayama, M.; Amaral, R. B.; Mazo, L. H.; Avaca, L. A.; Machado, S. A. S.; *Pesticidas: r. ecotocotox. e meio ambiente* **2005**, *15*, 65.
- Cooper, J.; Dobson, H.; *Crop Prot.* **2007**, *26*, 1337.
- http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/rel_anual_2001-2006.pdf, acessada em Dezembro 2007.
- Beyer, A.; Biziuk, M.; *Food Chem.* **2007**, *108*, 2008.
- Van der Hoff, G. R.; Van Zoonen, P.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *843*, 301.
- Motohashi, N.; Nagashima, H.; Parkanyi, C.; Subrahmanyam, B.; Zhang, G.; *J. Chromatogr., A* **1996**, *754*, 333.
- Hajslová, J.; Holadova, K.; Kocourek, V.; Poustka, J.; Godula, M.; Cuhra, P.; Kempny, M.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *800*, 283.
- Jimenez, J. J.; Bernal, J. L.; Nozal, M. J.; Toribio, L.; Martın, M. T.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *823*, 381.
- Menkissoglu-Spiroudi, U.; Fotopoulou, A.; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2004**, *84*, 15.
- Sanchez-Brunete, C.; Albero, B.; Martín, G.; Tadeo, J. L.; *Anal. Sci.* **2005**, *21*, 1291.
- Shimelis, O.; Yang, Y.; Stenerson, K.; Kaneko, T.; Ye, M.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1165*, 18.
- Rodrigues, M. V. N.; Reyes, F. G. R.; Magalhães, P. M.; Rath, S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 135.
- Gonzalez-Rodríguez, R. M.; Rial-Otero, R.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gandara, J.; *Food Chem.* **2008**, *107*, 1342.
- Salvador, M.; Frenich, A. G.; González, F. J. E.; Vidal, M.; *Chromatographia* **2006**, *64*, 667.
- Hajslová, J.; Zrostlikova, J.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1000*, 181.
- Montigny, C.; Lespes, G.; Potin-Gautier, M.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *819*, 221.
- Carson, L. J.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1981**, *64*, 714
- Stan, H. J.; Goebel, H.; *J. Chromatogr., A* **1983**, *268*, 55.
- Stan, H. J.; Goebel, H.; *J. Chromatogr., A* **1984**, *314*, 413.
- Stan, H. J.; Muller, H. M.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1988**, *11*, 140.
- Mallet, C.; Mallet, V. N.; *J. Chromatogr., A* **1989**, *481*, 37.
- Hernandez, F. H.; Grases, J. M.; Beltran, J.; Sancho, J. V.; *Chromatographia* **1990**, *29*, 459.
- Gillespie, A. M.; Walters, S. M.; *Anal. Chim. Acta* **1991**, *245*, 259.
- Erney, D. R.; Gillespie, A. M.; Gilvydis, D. M.; *J. Chromatogr., A* **1993**, *638*, 57.
- Lehotay, S. J.; Eller, K. I.; *J. AOAC Int.* **1995**, *78*, 821.
- Yamazaki, Y.; Ninomiya, T.; *J. AOAC Int.* **1996**, *79*, 787.
- Albero, B.; Sanchez-Brunete, C.; Tadeo, J. L.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5828.
- Albero, B.; Sanchez-Brunete, C.; Tadeo, J. L.; *Talanta* **2005**, *66*, 917.
- Holland, P. T.; McNaughton, D. E.; Malcolm, C. P.; *J. AOAC Int.* **1994**, *77*, 79.
- Bernal, J. L.; Del Nozal, M. J.; Jimenez, J. J.; Rivera, J. M.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *778*, 111.
- Cabras, P.; Anglont, A.; Mehs, M.; Minelli, E. V.; Pirisi, F. M.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *761*, 327.
- Molinari, G. P.; Cavanna, S.; Fornara, L.; *Food Addit. Contam.* **1998**, *15*, 661.
- Lentza-Rizos, C.; Avramides, E. J.; Cherasco, F.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *912*, 135.
- Frenich, A. G.; Bolaños, P. P.; Vidal, J. L. M.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1153*, 194.
- Thomsen, C.; Leknes, H.; Lundanes, E.; Becher, G.; *J. Anal. Toxicol.* **2002**, *26*, 129.
- Sanchez-Brunete, C.; Albero, B.; Tadeo, J. L.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1445.
- Saari, E.; Perämäki, P.; Jalonen, J.; *Microchem. J.* **2007**, *87*, 113.
- Zrostlíková, J.; Hajslova, J.; Godula, M.; Mastovska, E.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *937*, 73.
- Domotorova, M.; Kirchner, M.; Matisova, E.; Zeeuw, J.; *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 1051.
- Poole, C. F.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1158*, 241.
- Schenck, F. J.; Lehotay, S. J.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *868*, 51.
- Torres, M. E. H.; Gonzalez, F. J. E.; Cuadros-Rodríguez, L.; Lopez, E. A.; Vidal, J. L. M.; *Chromatographia* **2003**, *57*, 657.
- Grob, K.; Grob, G.; *J. Chromatogr., A* **1981**, *219*, 13.
- Klotz, W. L.; Schure, M. R.; Foley, J. P.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *930*, 145.
- Erney, D. R.; Pawlowski, T. M.; Poole, C. F.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1997**, *20*, 375.
- Hill, A. R. C.; Reynolds, S. L.; *Analyst* **1999**, *124*, 953.
- Vidal, J. L. M.; Arrebola, F. J.; Garrido-Frenich, A.; Martínez Fernandez, J.; Mateu-Sanchez, M.; *Chromatographia* **2004**, *59*, 321.
- Mercer, G. E.; *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 1452
- Kocourek, V.; Hajslova, J.; Holadová, K.; Poustka, J.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *800*, 297.
- Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.

51. Anastassiades, M.; Mastovská, K.; Lehotay, S. J.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1015*, 163.
52. Vogt, W.; Jacob, K.; Ohnesorge, A. B.; Obwexer, H. W.; *J. Chromatogr., A* **1979**, *186*, 197.
53. Vogt, W.; Jacob, K.; Obwexer, H. W.; *J. Chromatogr., A* **1979**, *174*, 437.
54. Pereira, A. S.; Aquino Neto, F. R.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 370.
55. Godula, M.; Hajslová, J.; Mastouska, K.; Krivanková, J.; *J. Sep. Sci.* **2001**, *24*, 355.
56. Rantakokko, P.; Yrityis, M.; Vartiainen, T.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1028*, 179.
57. Wylie, P. L.; Uchiyama, K.; *J. AOAC Int.* **1996**, *79*, 571.
58. Wylie, P. L.; Klein, K. J.; Thompson, M. Q.; Hermann, B. W.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1992**, *15*, 763.
59. Godula, M.; Hajslová, J.; Alterová, K.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, *22*, 395.
60. Grob Jr, K.; *J. Chromatogr., A* **1985**, *324*, 251.
61. Muller, H. M.; Stan, H. J.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1990**, *13*, 759.
62. Lehotay, S. J.; *J. AOAC Int.* **2000**, *83*, 680.
63. Erney, D. R.; Poole, C. F.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1993**, *16*, 501.
64. Kirchner, M.; Huskova, R.; Matisova, E.; Mocak, J.; *J. Chromatogr., A* **2008**, *1186*, 271.
65. Mastovska, K.; Lehotay, S. J.; Anastassiades, M.; *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 8129.
66. LePage, J. T.; Hebert, V. R.; Tomaszewska, E. M.; Rothlein, J. E.; McCauley, L.; *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 1788.
67. Johnson, P. D.; Duncan, A. R.; Brown, R. H.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *765*, 135.
68. Kumar, A.; Nadda, G.; Shanker, A.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1050*, 193.
69. Hennion, M.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *885*, 73.
70. Quintana, J.; Martí, I.; Ventura, F.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *938*, 3.
71. Jimenez, J.; Bernal, J.; Del Nozal, M.; Toribio, L.; Arias, E.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *919*, 147.
72. Podhorniak, L. V.; Negron, J. F.; Griffith Jr., F. D.; *J. AOAC Int.* **2001**, *84*, 873.
73. Barker, S. A.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *880*, 63.
74. Barker, S. A.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *885*, 115.
75. Goulart, S. M.; Queiroz, M. E. L. R.; Neves, A. A.; Queiroz, J. H.; *Talanta* **2008**, *75*, 1320.
76. Vieira, H. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 535.
77. Pinho, G. P.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2007.
78. Pinho, G.P.; Neves, A.A.; Uqueiroz, M.E.L.R.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 92.
79. González, F. J. E.; Torres, M. E. H.; Cuadros-Rodríguez, L. C.; Lopez, E. A.; Martínez Vidal, J. L.; *Analyst* **2002**, *127*, 1038.
80. González, F. J. E.; Torres, M. E. H.; López, E. A.; Cuadros-Rodríguez, L.; Vidal, J. L. M.; *J. Chromatogr., A* **2002**, *996*, 155.
81. Cuadros-Rodríguez, L.; García-Campana, A. M.; Almansa-López, E.; Egea-González, F. J.; Cano, M. L. C.; Frenich, A. G.; Marínez-Vidal, J. L.; *Anal. Chim. Acta* **2003**, *478*, 281.
82. Martínez-Galera, M.; Lopez-Lopez, T.; Gil-García, M. D.; Martínez Vidal, J. L.; Picon-Zamora, D.; Cuadros-Rodríguez, L.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375*, 653.
83. Bittencourt, L. M.; Coelho, J. M.; Mattos, L. V.; Queiroz, M. E. L. R.; Neves, A. A.; *Resumos do 21º Encontro Regional da SBQ*, Uberlândia, Brasil, 2007.
84. Cuadros-Rodríguez, L.; Gaèimiz-Gracia, L.; Almansa-Loèpez, E. M.; Bosque-Sendra, J. M.; *Trends Anal. Chem.* **2001**, *20*, 620.