



**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**

**DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS PIRETRÓIDES EM LEITE
BOVINO POR MEIO DA CROMATOGRÁFIA A GÁS
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE
ARMADILHA IÔNICA - GC/ITMS ("ION TRAP")**

ANDRÉ SASSINE

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Materiais.**

**Orientador:
Dr. José Oscar W. Vega Bustillos**

**São Paulo
2002**



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS PIRETRÓIDES EM LEITE BOVINO POR
MEIO DA CROMATOGRÁFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE
MASSAS DE ARMADILHA IÔNICA -GC/ITMS ("ION TRAP")**

ANDRÉ SASSINE



**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Materiais.**

**Orientador:
Dr. José Oscar W. Vega Bustillos**

**SÃO PAULO
2002**

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado:

A Vivian Cotait Sassine, pelo total apoio e incentivo.

Aos meus irmãos Wadih Sassine Neto e Ângela Sassine.

A Deborah Hanae Moria Sassine, pela paciência e apoio incondicional.

A Yasuo Kamijo Moria, pelo exemplo de perseverança.

A Margaret Gebara, pelo incentivo e pelas valiosas aulas da língua Inglesa.

Aos meus amigos, colegas de turma e professores da PUC-SP.

A Nazem Wadih Sassine e Fauze Sassine, em homenagem póstuma.

AGRADECIMENTOS

Ao IPEN-SP, em especial a todos os funcionários e pesquisadores do departamento do Centro de Química e Materiais Ambientais – CQMA, sem os quais este trabalho não poderia ser realizado.

Aos funcionários e pesquisadores do departamento de resíduos de pesticidas do Instituto Adolfo Lutz-SP, em especial a Dra. Heloísa H. B. de Toledo e à pesquisadora Vera R. R. Lemes, pelas orientações quanto ao método de extração utilizado.

Ao Dr. Igor Vassilieff e à pesquisadora Denize Z. Bissacot, do Instituto de Biociências da UNESP-CEATOX de Botucatu, pelo estímulo e orientação quanto à extração de resíduos de Piretróides em leite.

À Dra. Mitiko Yamaura do IPEN-SP, pelas prestativas discussões quanto ao método de extração.

Aos funcionários da empresa Varian Ind. e Com. Ltda., em especial a Adailton Silva dos Santos pela orientação técnica em espectrometria de massa.

À pesquisadora Mari Estela de Vasconcellos do IPEN-SP, pelo auxílio quanto à coluna cromatográfica.

Ao pesquisador Sérgio C. Moura do IPEN-SP, pelo suporte às atividades em laboratório.

Ao Dr. José Oscar W. Vega Bustillos do IPEN-SP, pela orientação permanente quanto à ciência da espectrometria de massa quadrupolar, pelo bom humor e pela paciência.

“Quem não lê, não pensa, e quem não pensa será sempre um servo.”

Paulo Francis

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS PIRETRÓIDES EM LEITE BOVINO POR MEIO DA CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ARMADILHA IÔNICA –GC/ITMS ("ION TRAP")

André Sassine

RESUMO

Neste trabalho procurou-se estabelecer as condições necessárias para a detecção e quantificação de resíduos de inseticidas Piretróides em leite bovino. A eficiência do método foi estabelecida através de experimentos de recuperação no qual foram acrescentadas quantidades conhecidas do Piretróide Cipermetrina ao leite bovino. Para este fim foi aplicado o método de extração com dispersão em matriz de fase sólida, seguido de purificação com coluna de sílica-gel. O extrato obtido foi analisado por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa – Ion-Trap (GC/MS-IT). Com o auxílio das técnicas de Armazenagem de Íons Seleccionados (AIS) e Monitoração de Íons Seleccionados (MIS) tornou-se possível seleccionar íons específicos do composto de interesse que puderam ser separados da matriz orgânica subjacente. Após o estabelecimento das condições ótimas para a detecção dos resíduos do Piretróide Cipermetrina, foram coletadas amostras de leite de um animal submetido a tratamento veterinário de parasitas utilizando-se um inseticida com um conteúdo 50g/L de Cipermetrina em sua formulação. Os dados obtidos indicam contaminação do leite num conteúdo máximo de 0,168 mg/kg após 24 horas da aplicação do inseticida. Considerando-se o limite máximo residual de 0,01 mg/kg para a Cipermetrina em leite, as amostras coletadas após 15 e 24 horas da aplicação do inseticida apresentaram concentrações cerca de dezesseis vezes superiores a este valor e, para a amostra coletada 11 dias após a aplicação, cerca de sete vezes superior a este valor. Após 17 dias do tratamento, a Cipermetrina no leite não foi detectada.

**DETERMINATION OF PYRETHROIDS INSECTICIDES RESIDUES IN THE
MILK OF LACTATING DAIRY COWS BY GAS CHROMATOGRAPHY – ION
TRAP MASS SPECTROMETRY – GC/ITMS**

André Sassine

ABSTRACT

The aim of this work was to establish the necessary conditions to detect and quantify Pyrethroid insecticides residues in milk of lactating dairy cows. The efficiency of the method was settled through recovery experiments in which known quantities of the Pyrethroid Cypermethrin were spiked up to milk. For this purpose, it was applied the matrix solid-phase dispersion method followed by clean-up with silica-gel column. The extract obtained was analysed by gas chromatography – ion trap mass spectrometry (GC/ITMS). With the aid of the Selected Ion Storage (SIS) and the Selected Ion Monitoring (SIM) techniques, It was feasible to select specific ions from the analite of interest, which can be separated from the organic matrix. After the stablishment of the optimum conditions for the detection of Pyrethroid residues of Cypermethrin, samples of milk were collected from a cow submitted to a veterinary treatment for elimination of parasites using an insecticide with 50g/L of the active ingredient in its formula. The data obtained show milk contamination with a maximum concentration of 0.168 mg/kg after 24 hours of the insecticide treatment. Considering the maximum residual limit for Cypermethrin in milk of 0.01 mg/kg, samples collected after 15 and 24 hour of the treatment shown concentrations about sixteen times above this value and, for samples collected after 11 days of the treatment, about seven times above this value. After 17 days of the treatment, Cypermethrin in the milk was undetected.

SUMÁRIO

	Páginas
I. INTRODUÇÃO	1
I. 1. Piretróides: Histórico e Desenvolvimento	1
I. 2. Características físicas e químicas de alguns Piretróides	2
I. 3. Uso de Piretróides	6
I. 4. Modo de ação	8
I. 4-1. A célula nervosa	8
I. 4-2. Potencial de repouso	9
I. 4-3. Potencial de ação	11
I. 5. Estéreo-especificidade na ação dos Piretróides	13
I. 6. Outros mecanismos de ação de inseticidas Piretróides	14
I. 7. Tipos de Piretróides com relação à ação tóxica	14
I. 8. Metabolismo e sinergismo	16
I. 9. Estudos toxicológicos	16
I. 10. Resistência aos Piretróides	17
I. 11. Resíduos de Piretróides em alimentos e no meio ambiente	18
I. 12. Métodos analíticos de detecção de Piretróides	19
II. OBJETIVOS	22
III. ANALISADORES E TÉCNICAS DE MEDIDA	23
III. 1. O cromatógrafo a gás e o espectrômetro de massas	23
III. 2. O espectrômetro de massa quadrupolar	24
III. 2-1. A armadilha iônica quadrupolar	25
III. 2-2. A estrutura da armadilha iônica quadrupolar	27
III. 2-3. A teoria de operação da armadilha iônica	30
III. 2-4. Um íon num campo quadrupolar	30
III. 2-5. A equação de Mathieu	31
III. 2-6. Os potenciais nos eletrodos	34
III. 2-7. A armadilha iônica “esticada”	36

III. 2-8. Regiões de trajetórias iônicas estáveis	37
III. 2-9. Freqüências seculares	40
III. 2-10. Excitação ressonante	42
IV. TÉCNICAS DE OPERAÇÃO DO ESPECTROMETRO DE MASSAS – I.T.	45
IV. 1. Ionização por impacto de elétrons (IE)	45
IV. 2. Ionização química (IQ)	45
IV. 3. Controle de ganho automático (CGA)	47
IV. 4. Detector de íons	48
IV. 5. Armazenagem de íons selecionados (AIS)	49
V. METODOLOGIA	52
V. 1. Verificações e calibração do espectrômetro de massas	52
V. 2. O impacto de elétrons (IE) e a função de controle de ganho automático-(CGA)	53
V. 3. Ionização química com metano	54
V. 4. O modo AIS (Armazenagem de Íons Selecionados)	56
V. 5. O modo MIS (Monitoração de Íons Selecionados)	56
V. 6. Os parâmetros do cromatógrafo a gás	56
V. 7. Características do espectrômetro de massas como detector	59
V. 7-1. Limite mínimo de detecção (L.M.D.) e quantificação (L.M.Q.)	59
V. 7-2. Sensibilidade	59
V. 7-3. Ruído	60
V. 7-4. Resposta universal	61
V. 7-5. Resposta linear	61
V. 8. Extração de Piretróides em leite	61
V. 9. Escolha do solvente	64
VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
VI. 1. Espectros de massas da Permetrina	66
VI. 2. Permetrina e metabólitos	75
VI. 3. Espectros de massas da Cipermetrina	77
VI. 3-1. Separação dos componentes da amostra via cromatógrafo a gás	77
VI. 3-2. Impacto de elétrons (IE)	78
VI. 3-3. Ionização química com metano (IQ)	81
VI. 4. Extração: experimentos de recuperação	84
VI. 5. Quantificação	88
VI. 6. Evitando contaminação	95

VI. 7. Recuperação de Cipermetrina em leite em função do conteúdo de água	97
VI. 8. Recuperação de Cipermetrina em leite em função da concentração	99
VI. 9. Limites de detecção e quantificação do Piretróide Cipermetrina	104
VI. 10. Determinação de Cipermetrina em leite bovino	110
VI. 11. Limites máximos de resíduos	116
VII. CONCLUSÕES	119
APÊNDICE	122
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

I. INTRODUÇÃO

Os Piretróides sintéticos constituem-se numa classe química de mais de 1000 compostos de poderosa ação inseticida. Neste capítulo abordamos aspectos concernentes a estes compostos do ponto de vista de seu desenvolvimento histórico, características físicas e químicas, usos, modos de ação, resíduos em alimentos entre outras características pertinentes. Além disso relacionamos as principais técnicas analíticas empregadas na detecção de resíduos de Piretróides, com ênfase em trabalhos que utilizam espectrômetros de massas.

I. 1. Piretróides: histórico e desenvolvimento

As propriedades inseticidas das flores de piretro têm sido reconhecidas desde a metade do século XIX, quando se iniciou a comercialização do "pó inseticida" derivado das flores do piretro da dalmácia, pertencente ao gênero *Crysanthemum* da família *compositae*. A produção comercial das flores iniciou-se no Japão e sobretudo no leste da África. Somado-se à sua atividade inseticida, um atrativo a mais das piretrinas era a sua não persistência no meio ambiente e a sua rápida atividade de "knock down" pela qual insetos voadores tornavam-se rapidamente incoordenados e inábeis ao vôo.

Anteriormente ao desenvolvimento do DDT (diclorodifenil-tricloroetano), o piretro era o principal inseticida, tanto para uso doméstico como agrícola, apesar de sua baixa estabilidade à luz. Seu uso foi estendido, nos anos 50, pela introdução do butóxido de piperonila e outros compostos sinergistas, que reduziram grandemente o custo unitário do tratamento dos grãos.

A baixa estabilidade à luz e o alto custo continuaram a ser um problema, até o desenvolvimento do Piretróides sintéticos que possuíam maior estabilidade e maior atividade inseticida. . Por exemplo, a Deltametrina que foi desenvolvida pelo Dr. Elliott, possui estabilidade à luz, é rapidamente biodegradável e é de 2000 a 5000 vezes mais tóxica às moscas domésticas do que a ratos, isto comparado com razões de toxicidade moscas/ratos de 58,90 para os Piretros ou de 11,30 para o DDT [1].

As piretrinas naturais são atualmente usadas principalmente como inseticidas domésticos, enquanto que o uso de Piretróides sintéticos, que representavam 20 a 25% do mercado mundial de inseticidas de folhagem em 1983, vem crescendo em grandes proporções [1].

O desenvolvimento dos Piretróides é dividido em gerações que têm início em 1949 com o surgimento da Aletrina que é sintetizada a partir da Cinerina I.

Na segunda geração surgem: Tetrametrina (1965), Resmetrina (1967), Biosmetrina (1967) e Bioaletrina (1969). Estes não foram bem sucedidos [2] para uso agrícola por apresentarem baixa eficácia no combate às pragas ou pela baixa estabilidade à luz solar, no entanto, foram bem aceitos para uso doméstico por serem mais eficazes que o Piretro. Estes ainda são utilizados na maior parte dos inseticidas.

Na terceira geração surgem o Fenvalerato (1972) e a Permetrina (1973), que são estáveis à luz solar, e aplicáveis na agricultura [2].

Por fim os de quarta geração que são Cipermetrina, Fenpropatrim, Flucitrinato e outros, os quais só apareceram no mercado na década de 80, também utilizados para fins agrícolas, apresentam eficácia a concentrações mais baixas que os anteriores, são foto-estáveis e tem uma maior durabilidade em sua ação inseticida [2].

Em função de sua aparente baixa toxicidade ao homem, os Piretróides se tornaram importantes no campo da saúde pública, sendo utilizados no controle de pragas urbanas. Um exemplo seria no combate a dengue, onde é utilizada uma mistura de Piretróides.

As formulações de Piretróides podem ser encontradas na forma de emulsões concentradas, pós hidratáveis, granulados e concentrados.

I. 2. Características físicas e químicas de alguns Piretróides

Na Tabela 1 listamos alguns dados físico-químicos de piretróides que são de extrema importância no estabelecimento da caracterização dos mesmos.

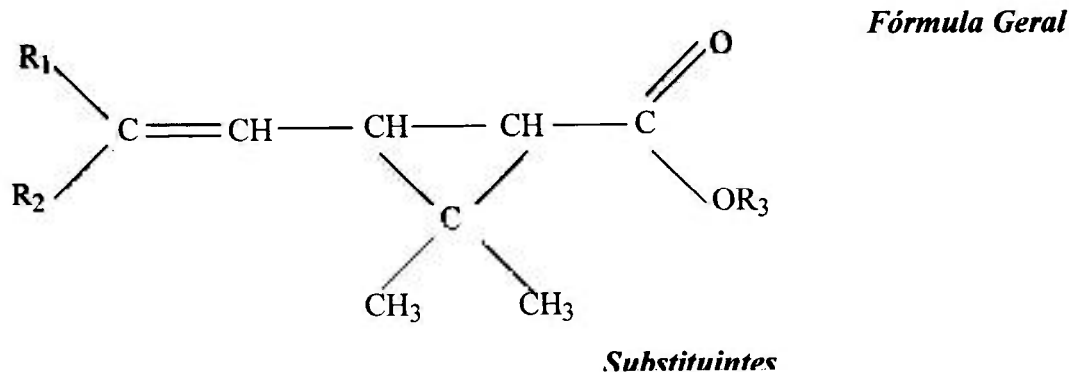
Tabela 1: Principais características físico-químicas de alguns piretróides.

Piretróide	Aspecto físico	Massa Molecular	Fórmula Química	Ponto de Ebulição
Aletrina	Líquido amarelo e viscoso	302,45	$C_{19}H_{26}O_3$	140°C a 0,1 mmHg
Bioresmetrina	Líquido altamente viscoso e amarelado	338,45	$C_{22}H_{26}O_3$	181°C a 0,1 mmHg
Cialotrina	Líquido viscoso amarelo	449,86	$C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$	187-191°C a 0,2 mmHg
Ciflutrina	Líquido viscoso amarelo e oleoso	434,29	$C_{22}H_{18}Cl_2FNO_3$	
Cipermetrina	Massa semi-sólida amarelada	416,30	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$	220°C
Deltametrina	Cristal incolor	505,22	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	
Esfenvalerato	Líquido amarelado	419,9	$C_{22}H_{22}NO_3Cl$	151-167°C
Fenotrina	Líquido incolor ou amarelado	350,46	$C_{23}H_{26}O_3$	
Fempropratrium	Líquido viscoso amarelado	349,43	$C_{22}H_{23}NO_3$	
Flucitrinato	Líquido viscoso âmbar	451,48	$C_{26}H_{23}F_2NO_4$	108°C a 35 mmHg
Fenvalerato	Líquido viscoso amarelado	419,91	$C_{25}H_{22}NO_3$	300 °C a 37 mmHg
Permetrina	Varia entre cristais incolores e líquido viscoso amarelado	391,24	$C_{21}H_{20}Cl_2O_3$	200°C a 0,01 mmHg
Resmetrina	Cristais incolores	338,48	$C_{22}H_{26}O_3$	180°C a 0,01mmHg
Tetrametrina	Cristal incolor	331,42	$C_{19}H_{25}NO_4$	180-190°C

Quimicamente os Piretróides sintéticos (Figura 1) são ésteres de ácidos específicos, isto é, ácido crisantêmico, ácidos crisantêmicos com halo-substituintes, ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutírico e álcoois, tais como: aletrolona e álcool 3-fenoxibenzil. Para certos piretróides os centros assimétricos existem na parte alcólica e/ou ácida, e os produtos comerciais algumas vezes consistem da mistura de isômeros ópticos (*1R/1S* ou *d/l*) e geométricos (*cis/trans*) [3]. Por exemplo, a Cipermetrina é um Piretróide sintético que possui três centros quirais e, portanto, oito isômeros ópticos. A Permetrina possui dois centros quirais e quatro isômeros ópticos. Observa-se que pares de enantiômeros representam diastêromeros com diferentes propriedades químicas, físicas e toxicológicas. A configuração do anel ciclopropílico, por exemplo, tem um efeito marcante na toxicidade da Cipermetrina, com os isômeros *1R-cis* constituindo-se nos mais tóxicos.

Grande parte da atividade inseticida dos Piretróides reside em somente um ou dois isômeros, sendo que em alguns casos (d-Fenotrina, Deltametrina) somente em um isômero [3].

Na Figura 1 observa-se a fórmula plana da estrutura molecular de alguns Piretróides onde podemos verificar a existência do anel ciclopropânico ligado a dois grupos metila (fórmula geral da Figura 1). A estrutura fenoxibenzil está presente em vários destes compostos como se pode observar pelos substituintes R3.



<u>Composto</u>	R_1	R_2	R_3
<i>Aletrina</i>	— CH ₃	— CH ₃	
<i>Permetrina</i>	— Cl	— Cl	
<i>Resmetrina</i>	— CH ₃	— CH ₃	
<i>Fenpropanato</i>	— CH ₃	— CH ₃	
<i>Cipermetrina</i>	— Cl	— Cl	
<i>Deltametrina</i>	— Br	— Br	

Figura 1. Fórmula estrutural de alguns inseticidas piretróides onde visualizamos a fórmula geral e seus respectivos substituintes.

I. 3. Uso de Piretróides

Os Piretróides são utilizados no controle de insetos na agricultura, e especialmente em ambientes domésticos e em saúde pública.

Na Tabela 2 encontram-se algumas aplicações de Piretróides usados no combate a pragas agrícolas e na Tabela 3 são mostrados exemplos de formulações para uso domiciliar onde são utilizados os inseticidas Piretróides.

Tabela 2. Exemplo do emprego de piretróides na agricultura.

Pragas	Inseto/Ácaro	Nome técnico
BRASSICÁCEAS		
Curuquerê da Couve	<i>Ascia monuste</i>	Permetrina
Traça das Crucíferas	<i>Plutella xylostella</i>	Permetrina
		Deltametrina
CUCURBITÁCEAS		
Broca dos Frutos	<i>Diaphania spp.</i>	Deltametrina
Ácaros	<i>Tetranychus urticae</i>	Deltametrina
	<i>Polyphagotarsonemus latus</i>	
	<i>Ceratoma spp.</i>	
FABÁCEAS		
Minador das Folhas	<i>Liriomyza spp.</i>	Deltametrina
SOLANÁCEAS		
Tripés	<i>Frankliniella schulzei</i>	Permetrina

Tabela 3. Formulações comerciais de inseticidas domésticos contendo Piretróides.

Fabricante	Nome do Produto	Formulação
Reckitt & Colman	Rodasol (Mata tudo)	Diclorvos (DDVP) 0,49%, Tetrametrina 0,13%, sinergista solvente derivado do petróleo.
Reckitt & Colman	Rodasol (Ação e Proteção)	d-Fenotrina 0,04%, d-Aletrina 0,29%, solvente derivado do petróleo, água.
Reckitt & Colman	Detefon	Diclorvos (DDVP) 0,45%, Tetrametrina 0,10%, sinergista, , solventes derivado do petróleo.
Bayer	Baygon (Branco)	Transflutrina 0,04, d-Fenotrina 0,10, etano, emulsificante, solvente e propelente.
Bayer	Tugon	Tetrametrina 0,20%, d-Fenotrina 0,10, querosene desodorizado, emulsificantes, solvente e propelente.
Itamaraty Dominó	Tufão	d-Tetrametrina 0,20%, Cifenotrina 0,075%, isopar H, span 80, tween 80, nitrato de sódio, benzoato de sódio, água.
Poett San Juan S.A	SBP (Ação imediata)	Esbiotrina 0,15% (p/p), Permetrina 0,055% (p/p), solvente, água.
Poett San Juan S.A	SBP	d-Aletrina 0,135% (p/p), d-Tetrametrina 0,1% (p/p), Cifenotrina 0,1% (p/p), butóxido de piperonila 0,28% (p/p).
Johnson & Johnson	Raid (Moscas e mosquitos)	d-Aletrina 0,1%, Permetrina 0,1%, Tetrametrina 0,35%, solvente derivado do petróleo, água.
Bayer	Baygon Genius (líquido)	Bioaletrina 3,6%, butóxido de piperonila, querosene desodorizado.

Um dos Piretróides mais consumidos a nível mundial é a Deltametrina que em 1987 atingiu a marca de 250 toneladas. Neste ano, 45% de seu consumo ocorreu principalmente no combate a pragas no algodão e grãos como café, milho, cereais, frutas e vegetais, além da utilização em produtos armazenados. Deltametrina e Cipermetrina, entre outros piretróides, são também utilizados em saúde animal, controle de vetores e saúde pública [3, 4].

Na África, Ásia e Oceania têm sido utilizadas redes tratadas com inseticidas Piretróides no combate à Malária. Estas redes colocadas em volta das camas propiciam uma melhor proteção do que a utilização de "sprays". Cabe salientar que nas décadas de 1940 a 1960 eram utilizados inseticidas muito mais nocivos a humanos, quais sejam: DDT e Malation [5]. Outro estudo realizado com triatomíneos mostrou que o efeito de excito-repelência provocado pelo Piretróide Deltametrina sobre estes insetos é uma vantagem adicional ao poder do inseticida, pois dificultaria a instalação de novas colônias a partir de fêmeas que ingressassem nas casas através do vôo, além de promover o desalojamento de exemplares presentes nas frestas das paredes e outros esconderijos [6]. Isto é particularmente útil no combate ao *Triatoma infestans*, um dos mais importantes vetores da doença de Chagas [7].

I. 4. Modo de ação

O Piretro e os Piretróides são basicamente toxinas de canais de sódio, ou seja, atuam na membrana nervosa de tal forma a manter seus canais de íons sódio abertos, causando a despolarização dos neurônios [8]. Os Piretróides são venenos de contato que penetram rapidamente no sistema nervoso e causam sintomas característicos no inseto. Uma fase de excepcional excitação é seguida por distúrbios de coordenação de movimento, paralisia e finalmente morte [9]. Para que esse mecanismo seja compreendido, é necessário entendermos como ocorrem os estímulos elétricos no neurônio.

I. 4-1. A célula nervosa

Os neurônios são células excitáveis, ou seja, são capazes de auto-gerarem impulsos eletroquímicos. São formados basicamente por Soma + Axônio + Dendritos + Sinapse (Figura 2).

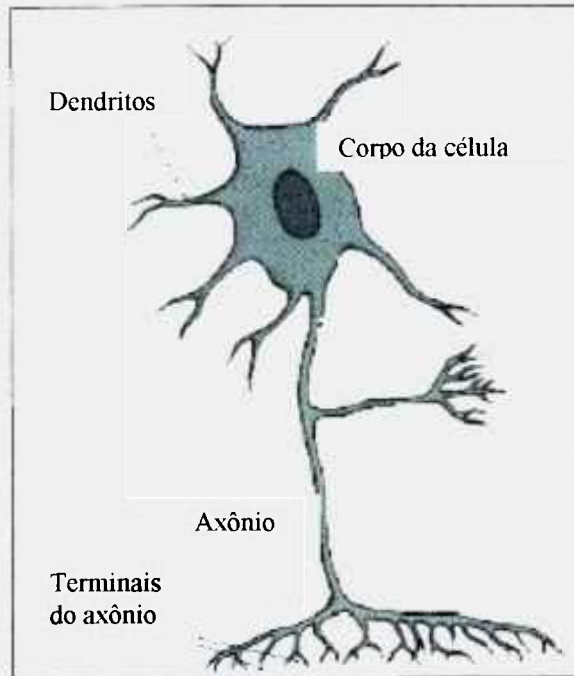


Figura 2. Componentes básico do neurônio: Soma, Axônio, Dendritos e Sinapses.

-Dendritos: recebem os impulsos e os envia para o soma.

-Soma: contém o núcleo e outras organelas.

-Axônio: carrega os impulsos para o soma e dendritos

-Sinapses: pequenos espaços entre os dendritos e axônios pelos quais os neurotransmissores são liberados.

I. 4-2. Potencial de repouso

Verifica-se através de medidas com o axônio gigante da lula, cujo comprimento é o do corpo da lula e a espessura é de 1 mm, que existe um potencial negativo dentro da célula que vale aproximadamente -90 mV. O Potencial de Repouso é originado através da diferença de potencial gerada pela bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$. Esta bomba move 3 íons de Na^+ para fora do neurônio e 2 íons de K^+ para dentro (Figura 3).

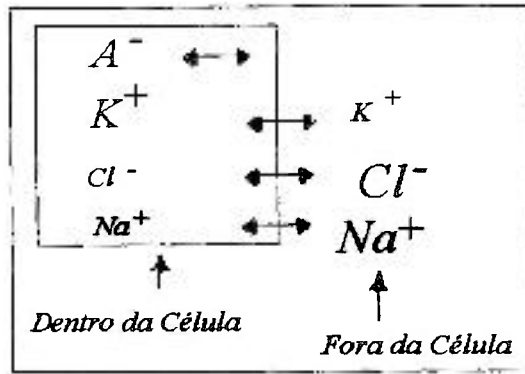


Figura 3. Movimento dos principais íons através da membrana de uma célula nervosa.

A membrana da célula em repouso é muito mais permeável a íons K^+ do que a outros íons tais como Cl^- e Na^+ [10]. Os íons são movimentados através da membrana celular da seguinte forma: Uma molécula carreadora fragmenta as moléculas de ATP (Adenosina-Trifosfato) e utiliza sua energia para promover a transferência de íons Na^+ e K^+ . São chamadas ATPase como por exemplo a Globulina (95.000 u.m.a.) e uma Glicoproteína (55.000 u.m.a.). Uma maneira de se avaliar o potencial de repouso (força eletromotriz) é utilizar a fórmula de Nernst para o K^+ (Equação 1.1), qual seja:

$$fem(\text{milivolts}) = -61 \cdot \log \frac{\text{Concentração} - \text{Interna}}{\text{Concentração} - \text{Externa}} \quad (1.1)$$

Por exemplo, para o íon potássio (K^+) a concentração interna = 140 mEq/L e concentração externa = 4 mEq/L. Substituindo em (1) temos:

$$fem = -61 \cdot \log \frac{140}{4} \quad (1.2)$$

$$fem = -94mV \quad (1.3)$$

Verificamos pela equação (1.3) que a *fem* obtida é um valor aproximado para o valor do potencial de repouso dentro do neurônio que é de -90 mV [11].

I. 4-3. Potencial de ação

Qualquer fator que aumente a permeabilidade da membrana em relação ao sódio produzirá um estímulo nervoso, tais como:

- 1) Estimulação elétrica
- 2) Compressão mecânica da fibra
- 3) Aplicação de compostos químicos à membrana

Existem canais pelos quais os íons Na^+ podem se difundir quando estimulados. São espécies de poros ovalados. Os canais são guardados por um portão dotado de carga elétrica que pode abrir ou fechar. Em repouso os portões de Na^+ estão quase completamente fechados e os de K^+ estão parcialmente abertos (Figura 4).

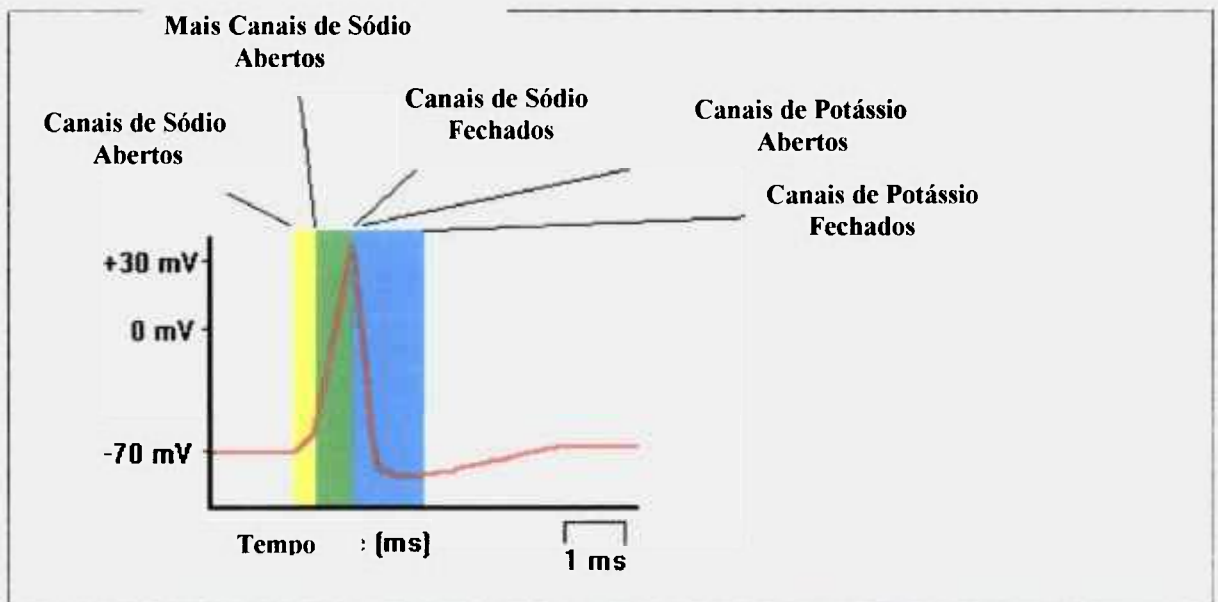


Figura 4. Variação do potencial elétrico de uma célula nervosa em função do tempo. O potencial é regulado pela abertura e fechamento de canais de Sódio e Potássio.

Nestas condições os canais de K^+ são cerca de 50 a 100 vezes mais permeáveis que os canais de Na^+ . No entanto, quando esses portões estão completamente abertos, a permeabilidade dos canais de Na^+ pode aumentar em até 5000 vezes, enquanto que os canais de K^+ podem aumentar em apenas 50 vezes [12]. A ação dos Piretróides ocorre justamente nos canais de sódio, provocando mudanças súbitas em sua função. Após a

modificação pelos Piretróides, os canais de sódio continuam com muitas das suas funções normais, retendo sua seletividade para íons de sódio. No entanto, a cinética dos canais de sódio é drasticamente alterada. Embora a ativação da corrente de íons sódio pela despolarização da membrana seja pouco afetada pelos piretróides, a razão da desativação desta corrente, a qual põe fim ao potencial de ação, torna-se extremamente lenta nos canais modificados [1]. Após o término do potencial em ponta (comumente denominado, impulso nervoso), que dura cerca de 0,4 ms (Fig. 5), o potencial da membrana, que sofreu a ação do Piretróide, não retorna totalmente ao seu nível de repouso durante alguns milissegundos. Isso é particularmente provável de acontecer quando uma série de potenciais de ação são repetidos rapidamente. É o denominado pós-potencial negativo [10, 13]. Em altas concentrações do Piretróide, este efeito pode tornar-se suficientemente grande de tal forma a despolarizar completamente a membrana nervosa, bloqueando sua excitabilidade. Este é usualmente um efeito de alta-dosagem, mas a baixas concentrações, a lenta despolarização da membrana é ainda suficiente para causar uma ação repetitiva. Portanto, um potencial de ação (normal) leva a uma seqüência de potenciais de ação anormais. Tal efeito pode ser produzido pela modificação de pouco menos de 0,1% dos canais de sódio.

L 5. Estéreo especificidade na ação dos Piretróides

Um fator que leva a complicações quanto à análise do efeito tóxico de inseticidas Piretróides é introduzido pela existência de pelo menos quatro formas isoméricas de Piretróides. A interação com o complexo de canais de sódio é altamente estéreo-específica, com os isômeros *1R* e *1S cis* ligando-se competitivamente a um sítio e os isômeros *1R* e *1S trans* ligando-se não competitivamente a *outro* sítio. As formas *1S* não modificam a função do canal mas bloqueiam o efeito dos isômeros *1R*. Na totalidade dos mamíferos, os isômeros *1R* são portanto ativos e os isômeros *1S* são inativos e essencialmente não tóxicos. Isomerismo no terceiro carbono do anel ciclopropânico nos dá os isômeros *cis* e *trans* os quais apresentam atividade inseticida mas diferem na toxicidade para mamíferos, sendo que isômeros *cis* possuem por volta de 10 vezes maior potência do que os do tipo *trans*. Um centro isomérico final é gerado se um substituinte ciano (CN) é adicionado ao álcool, produzindo oito possíveis isômeros. Novamente, a potência é afetada, visto que somente as formas α -*S* e não as α -*R* serem tóxicas, tanto para insetos como para mamíferos. Esta estéreo-especificidade tem sido explorada na síntese de isômeros puros (Deltametrina), produzindo assim alto grau de seletividade toxicológica [14].

I. 6. Outros mecanismos de ação de inseticidas piretróides

A interação com os canais de sódio não é o único mecanismo de ação proposto para Piretróides. Seus efeitos no sistema nervoso central tem levado vários autores a sugerir ações via antagonismo do ácido γ -aminobutírico (GABA), inibição de mediadores, modulação da transmissão colinérgica nicotínica, aumento da liberação de noradrenalina ou ação nos íons Cálcio. Como os agentes farmacológicos específicos de neurotransmissores oferecem pequena ou parcial proteção contra envenenamento, é pouco provável que um desses efeitos represente o mecanismo primário de ação dos Piretróides e muitos dos neurotransmissores liberados são secundários no que diz respeito ao aumento da entrada de Sódio [1].

I. 7. Tipos de Piretróides com relação à ação tóxica

Para o entendimento de sua ação tóxica, os compostos Piretróides são incluídos em duas classes distintas:

Classe I, representada pela Aletrina, Resmetrina e Permetrina. São compostos que determinam em ratos, efeitos neurológicos de origem periférica, provocando um quadro de agressividade, tremores espasmos convulsivos, incoordenação e prostração. Estes sinais e sintomas são conhecidos por Síndrome T (tremores).

Classe II, representada pelos compostos que possuem em comum a estrutura alfa-ciano-fenoxibenzil (Fenopropanato, Cipermetrina, Deltametrina). Estes compostos determinam efeitos de origem central, produzindo salivação excessiva, movimentos irregulares dos membros, convulsões tônicas e clônicas, e sensibilidade aumentada aos estímulos externos. A intoxicação pelos compostos da classe II é conhecida como síndrome CS (coreoatetose e salivação) [14].

Nos envenenamentos por ingestão, os sintomas iniciais compreendem dores epigástricas, náuseas e vômitos. Nos casos graves ocorrem fasciculações, especialmente nos músculos das extremidades, ataques convulsivos, sonolência e coma. A morte ocorre por falência respiratória [10].

Observando a Tabela 4 podemos avaliar quantitativamente a toxicidade de alguns Piretróides, através dos valores de dose letal aguda, DL_{50} . Verifica-se uma grande variação de DL_{50} no que diz respeito ao tipo de Piretróide e ao modo de aplicação do mesmo [1].

Tabela 4. Valores de DL₅₀ aguda de inseticidas piretróides em ratos.

Classe do Composto	Composto	LD ₅₀ (mg/kg)	LD ₅₀ (mg/kg)
		Via Intravenosa	Via Oral
I	Aletrina	3,5	200
I	Bartrina	-----	23600
I	Bioaletrina	4,0	1030
I	Bioresmetrina	340	>8000
I	Cismetrina	6,50	63
I	Fenflutrina	1,00	120
I	<i>Trans</i> _Fluorocifenotrina	6,00	-----
I	Kadetrina	0,50	-----
I	Permetrina	>250	1500
I	Fenotrina	472	>5000
I	Piretrina I	5,00	340
I	Resmetrina	165	1347
I	Tetrametrina	2,30	>4000
Intermediário	Cifenotrina	5,00	-----
Intermediário	Fenopropanato	2,50	28
Intermediário	Flucitrinato	-----	67
II	Ciflutrina	5,00	-----
II	Cialotrina	-----	144
II	Cipermetrina	55,00	900
II	Deltametrina	2,30	52
II	Fenvalerato	75,00	450
II	<i>cis</i> _Fluorocifenotrina	0,60	-----

Nas exposições ocupacionais com poeiras finas e aerossóis ou quando do contato dérmico, ocorrem ardência e sensação de formigamento na face e vertigens 4 a 6 horas após a exposição. Em crianças observam-se acidentes oculares com abrasão da córnea pelo uso inadequado de shampoos contendo Piretróides como, por exemplo, os usados no combate a piolhos.

I. 8. Metabolismo e sinergismo

A relativa resistência dos mamíferos aos Piretróides pode ser quase que totalmente atribuída a sua habilidade de rapidamente hidrolisar os Piretróides. Piretróides halogenados tais como, Ciflutrina, Cipermetrina e Permetrina são rapidamente metabolizados por clivagem hidrolítica da ligação éster, seguido de oxidação, produzindo os ácidos *cis*- e *trans* 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico (DCCA), ácido fenxibenzóico (3-PBA) e ácido fluorofenoxibenzóico (FPBA). Estes metabólitos são parcialmente conjugados com a glicina ou como ácido glicurônico e finalmente eliminados através dos rins. Os compostos com estrutura alfa ciano-3-fenoxibenzil são excretados mais lentamente [7, 14].

Na medida em que a eliminação metabólica determina largamente a toxicidade, a inibição da atividade oxidante e hidrolítica com sinergistas como butóxido de piperonila ou DEF (tributilfosforotritioato), um organofosforado usado como desfoliante agrícola, provocam um grande aumento na toxicidade. O elemento sinergista potencializa o composto inseticida mas, no entanto, o mesmo não tem necessariamente qualquer atividade intrínseca. O chamado sinergismo, que foi inicialmente observado numa mistura de Piretro e óleo de sésamo, pode ocorrer com vários compostos, que são usualmente caracterizados pela presença do grupo metilenodióxido. A extensão do efeito "knock-down" para doses sub-letais de Piretróides obtido na presença de sinergistas indica que o sinergista tem uma influência inibitória no processo de desintoxicação no inseto. O sinergista compete com o inseticida e é degradado oxidativamente pela enzima. O grupo metilenodióxido é o ponto favorecido ao ataque. O efeito sinergista é altamente dependente da natureza do Piretróide e é marcadamente intenso nos Piretróides naturais. Outros exemplos de importantes sinergistas são: Sesamin, Tropital, Sesamex, Synepirin 500, Safroxan, Propil-isome, entre outros [13].

I. 9. Estudos toxicológicos

Os Piretróides sintéticos são versões modificadas do inseticida natural piretrina, isolado do crisântemo. Estas modificações os tornam lipofílicos e persistentes, aumentando a probabilidade de acumulação nos tecidos animais (incluindo seres humanos). Estudos foram realizados com o objetivo de se determinar a habilidade de alguns Piretróides de interromperem a sinalização estrogênica, em experimentos que

utilizaram uma cultura celular de células humanas de câncer de mama (MCF-7), utilizando-se dois ensaios: expressões de proliferação celular de pS2 e MCF-7. O pesticida Piretróide Sumitrina comportou-se como um mímico clássico do estrogênio. Ele provocou indução de pS2 e proliferação celular em níveis muito baixos, mas seu impacto foi eliminado quando o mesmo foi combinado com um anti-estrogênico. Isto indica que o mecanismo de ação da Sumitrina ocorre via interação com o receptor estrogênico. O Fenvalerato comportou-se de uma maneira distinta. Este pesticida provocou indução de pS2 em níveis bastante baixos, no entanto, exposições maiores foram necessárias para causar proliferação celular. Em níveis de 1 μM o Piretróide *d-trans* Aletrina é um bloqueador moderado de estrogênio, mas em níveis altos o mesmo provocou respostas similares ao estrogênio [15].

Com o intuito de verificarem-se efeitos toxicológicos no sistema nervoso central e em função da falta de informação a este respeito, procurou-se estudar os efeitos da exposição repetitiva da Cipermetrina por meio da monitoração da atividade eletroencefalográfica em ratos. A Cipermetrina foi administrada diariamente em doses de 300 mg/kg, abaixo da LD_{50} . Atividade epiléptica paroximal foi observada após o primeiro e segundo dia da administração de Cipermetrina. Alguns dos eventos paroximais se apresentaram como anomalias comportamentais, tais como fissuras clônicas e tônicas. Estes efeitos são importantes porque poderiam estar relacionados à incidência de atividade epiléptica em humanos cronicamente expostos à Cipermetrina [16].

Piretróides tais como Permetrina, Ciflutrina e Cipermetrina entre outros, tem se mostrado altamente tóxicos para peixes e outros organismos aquáticos. Verificou-se que concentrações extremamente pequenas do Piretróide Cipermetrina (0,2 $\mu\text{g/L}$), utilizado no combate a parasitas do Salmão, são letais para larvas de Lagosta e Lagostas adultas [17]. Os autores Sigh e Srivastava estudaram o efeito tóxico do Piretróide Permetrina em peixes da espécie *Channa striatus* e os resultados indicam que a Permetrina bloqueia o metabolismo aeróbico e anaeróbico dos peixes expostos [18].

I. 10. Resistência aos Piretróides

A longa exposição de populações de insetos a inseticidas Piretróides tem levado a resistência ao “knock-down” que tem sido relacionada a mudanças estruturais nos canais de Sódio. Os canais de Sódio para moscas domésticas são 100 vezes menos sensíveis a Piretróides do que os das moscas selvagens. Um estudo de H. Vais et al.

identificou um amino-ácido responsável pela maior sensibilidade ao Piretróide da variedade de moscas que não sofreu a mutação (metionina) e da variedade menos sensível que no mesmo sítio sofreu a mutação. O amino-ácido metionina foi incorporado ao material genético de canais de sódio de ratos e verificou-se um aumento de 100 vezes na sensibilidade destes à Deltametrina relativamente a variedade de ratos selvagens. Isto sugere que a baixa toxicidade a Piretróides em mamíferos pode ser em parte atribuída a diferenças estruturais entre os canais de sódio de mamíferos e insetos e não apenas a fatores metabólicos [19]. Outros estudos mostram evidências de que mutações em genes de canais de sódio têm acarretado aumento na resistência ao “knockdown” para algumas espécies de insetos [20, 21, 22].

I. 11. Resíduos de Piretróides em alimentos e no meio ambiente

Informações da WHO (World Health Organization) dão conta de que os inseticidas Piretróides são foto-degradáveis tanto em água quanto no solo. No entanto a relativamente rápida degradação de Piretróides como Permetrina, Cipermetrina, Deltametrina entre outros, não impossibilita que os mesmos estejam presentes como resíduos em alimentos e no meio ambiente [23, 24, 25]. Por exemplo, a Deltametrina é degradada em algodão com uma meia vida de 1,1 semanas, e o tempo necessário para a eliminação de 90% da sua quantidade é de 4,6 semanas. A Permetrina em plantas, se degrada com uma meia vida de aproximadamente 10 dias, enquanto que no solo a mesma possui uma meia vida de 28 dias. A utilização de inseticidas Piretróides em meio doméstico pode levar à acumulação dos mesmos em habitações. Após uso interno, resíduos do inseticida Cipermetrina podem ser encontrados na poeira e em carpetes, com concentrações de até 4 mg/kg. A concentração no ar, após tratamento em ambiente fechado, aumenta rapidamente e posteriormente pode ficar relativamente constante por meses, em valores nos quais os Piretróides podem causar efeitos adversos (3 a 8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) [23].

No Brasil os Piretróides são largamente utilizados no rebanho de gado leiteiro, no combate a carrapatos e moscas-do-chifre. Estudos realizados após aplicação dérmica comprovaram a existência de resíduos em leite. Após a aplicação de Cipermetrina, foi constatada a presença de 0,36 mg/kg (360 ppb) do Piretróide no dia da aplicação, e de 0,05 mg/kg (50 ppb) 28 dias após a aplicação. Em Deltametrina, constatou-se a presença de 0,51 mg/kg (510 ppb) no primeiro dia e de 0,20 mg/kg (200 ppb) após 28 dias [26, 27]. De

acordo com o Codex Alimentarius [26], os resíduos máximos permitidos para Cipermetrina e Deltametrina em leite de vaca são respectivamente 0,01 mg/kg (10 ppb) e 0,05 mg/kg (50 ppb); no entanto os níveis detectados foram várias vezes superiores a estes valores [26].

Informações da WHO mostram que após injeção intravenosa de 0,27 g de Deltametrina marcada com ^{14}C em vacas Jersey leiteiras, somente 0,4% do composto foi encontrado no leite total. Além disto, níveis de resíduos de 0,045 mg/kg (45 ppb) e 0,92 mg/kg (920 ppb) foram encontrados no leite total e na gordura da manteiga, respectivamente, 1 dia após a administração do inseticida [3].

I. 12. Métodos analíticos de detecção de Piretróides

Um das técnicas mais utilizadas na detecção de Piretróides é a Cromatografia a Gás com Detector de Captura de Elétrons (GC-ECD). Foram reportados os seguintes métodos:

- Extração automatizada em fase sólida acoplada a um GC-ECD utilizando uma combinação de extração e “clean-up” de Piretróides em análise de águas superficiais [28];
- Extração seletiva de resíduos de pesticidas Piretróides em leite por dispersão em matriz de fase sólida em leite [29];
- Método semiautomático de análise multiresidual por cromatografia a gás de 25 pesticidas organoclorados e Piretróides em vegetais [30];
- Análise multiresidual de pesticidas em frutas e vegetais por cromatografia de permeação em gel seguida por detecção por GC-ECD e Espectrometria de Massas [31];
- “Clean-up” de vegetais extraídos por partição em matriz sólida em resíduos de Piretróides determinados por GC-ECD [32];
- Piretrinas naturais e 12 piretróides sintéticos em vegetais, frutas, feijões e folhas de chá por extração com acetona ou acetonitrila, partição com hexano, “clean-up” com coluna de Florisil e detecção com GC-ECD capilar [9];
- Junting Liu et al. determinaram as condições para extração por fase sólida de mistura de organofosfatos e Piretróides sintéticos em plasma, urina e sangue humanos com detecção por Cromatografia a Gás e detector de ionização por chama (GC-FID) [33].

Outra técnica bastante utilizada constitui-se na cromatografia líquida de alta resolução, HPLC. Foram reportados os seguintes métodos:

- Separação rápida e identificação de compostos organoclorados e Piretróides por HPLC e detecção UV [34];
- Determinação de Cipermetrina, Fenvalerato e Permetrina no solo e em águas subterrâneas por HPLC utilizando-se regressão por mínimos quadrados e detecção UV [35];
- Determinação simultânea de Tralometrina, Deltametrina e compostos em água, sedimentos e tecido de peixes em níveis de ppb e ppt por HPLC (sílica-gel) com detecção radiométrica [36].

A espectrometria de massas quadrupolar acoplada à cromatografia a gás (GC/MS) tem sido largamente utilizada para a detecção de Piretróides, não só para confirmação dos resultados de outras técnicas, mas também como um método independente, sobretudo por sua seletividade e caracterização inequívoca e simultânea dos pesticidas a serem analisados. Isto se evidencia na comparação com métodos puramente cromatográficos, visto que estes, freqüentemente, dependem da comparação com padrões via tempos de retenção. Ao contrário, a espectrometria de massas determina os fragmentos iônicos originados da molécula de interesse e os compara com num banco de dados armazenado em um micro computador e, em alguns casos, determina o pico molecular. O método é bastante adequado à determinação de resíduos em alimentos e o limite mínimo de detecção esta geralmente abaixo dos níveis de tolerância, que variam de 0,1 a 50 ppm [9]. Foram reportados os seguintes métodos:

- Análise rápida de uma variedade de classes químicas de pesticidas em água por extração em fase sólida "off-line" e GC/MS-IT [37];
- Determinação de inseticidas piretróides por GC/MS-MS [38];
- Estudo interlaboratorial de identificação e quantificação de multiresíduos Piretróides em produtos agrícolas por GC-MS [39];
- Análise ambiental de Cipermetrina e seus produtos de degradação após aplicações florestais [40];
- Desenvolvimento de análises simultâneas de pesticidas organonitrogenados e Piretróides com GC/MS [41];
- Otimização e avaliação da cromatografia a gás de baixa pressão acoplada a espectrometria de massas para análise rápida de múltiplos resíduos de pesticidas em alimentos [42];
- Utilização da técnica de ionização química para análise de Deltametrina por GC/MS [43];
- Extração de poeira "indoor" ultrasonicamente ou pela técnica Soxhlet com tolueno e etil-acetato e detecção via GC/MS [44];

- Monitoração de metabólitos de Piretróides em urina humana utilizando-se extração por fase sólida seguida de GC-MS “tandem” [45];
- Estudo comparativo entre as técnicas de ionização por impacto de elétrons e ionização química na análise do inseticida Permetrina via GC/MS-IT [46];
- análise de resíduos de pesticidas em alimentos utilizando GC-MS tandem [47];
- Desenvolvimento de método analítico para a determinação de inseticidas Piretróides sintéticos no solo via GC/MS operado no modo de ionização química negativa [48] entre outros.

II. OBJETIVOS

O presente trabalho tem os seguintes objetivos:

- 1) Estudar compostos Piretróides no que diz respeito a seus espectros de massas formados por impacto de elétrons e ionização química com metano.
- 2) Otimizar as condições experimentais de detecção destes compostos via GC/MS-IT tanto no aspecto cromatográfico como na utilização de técnicas de seleção de íons no intuito de atingir baixos limites de determinação e quantificação.
- 3) Aplicar uma metodologia de extração de pesticidas Piretróides em leite através de experimentos de recuperação visando à detecção dos mesmos em amostras comerciais.
- 4) Aplicar a metodologia otimizada na verificação da presença do Piretróide Cipermetrina no leite de um animal tratado com um carrapaticida e inseticida comercial que possui em sua formulação o referido Piretróide.
- 5) Abordar aspectos teóricos concernentes à física dos espectrômetros de massa de campos quadrupolares relacionando-os às soluções estáveis da equação de Mathieu e a seus diagramas de estabilidade.

Destacamos o item 4 como de maior relevância na determinação de inseticidas usados na combate a parasitas no gado leiteiro. Parte do inseticida aplicado pode ser encontrado no leite e portanto, se constitui numa fonte de contaminação quando da ingestão do referido leite por seres humanos.

III. ANALISADORES E TÉCNICAS DE MEDIDA

O objetivo deste capítulo é possibilitar a compreensão da técnica de cromatografia a Gás acoplada à espectrometria de massas Quadrupolar de Armadilha Iônica, com ênfase nos aspectos teóricos e experimentais da espectrometria de massas "Ion Trap" (Armadilha Iônica).

III. 1. O cromatógrafo a gás e o espectrômetro de massas

A Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS) constitui-se em uma das técnicas mais efetivas na separação, detecção e caracterização de componentes de uma mistura orgânica complexa. No cromatógrafo a gás a amostra é previamente vaporizada no sistema de injeção e posteriormente separada pela coluna cromatográfica [49]. A coluna possui no seu interior um material adsorvente com as seguintes características gerais: estabilidade térmica, estabilidade física e ligações cruzadas. Este material é denominado fase estacionária da coluna cromatográfica. Alguns exemplos são: Dimetil Siloxana, Polietileno Glicol e Dimetil Silarileno entre outros. A amostra, previamente vaporizada, é arrastada por um gás inerte (fase móvel) através da coluna (fase estacionária). Os compostos são separados de acordo com suas características físicas e químicas relativamente à fase estacionária e emergem da coluna com tempos distintos (tempos de retenção). A separação em si baseia-se na adsorção física e química das substâncias na fase estacionária e de suas volatilidades [50]. Quando uma das substâncias emerge da coluna e ingressa na armadilha iônica através da linha de transferência (Figura 5), a mesma interage com elétrons acelerados ou íons previamente ionizados perdendo sua neutralidade e fragmentando-se. Portanto, neste processo, os íons e fragmentos iônicos adquirem carga e são aprisionados por um campo eletromagnético quadrupolar. Posteriormente, através do rampeamento da amplitude de tensão imposta ao "Ion-Trap", os íons são ejetados axialmente na ordem crescente de suas relações massa/carga. Os íons atingem um multiplicador de elétrons que produz um sinal proporcional ao número de íons da amostra. O sinal da corrente iônica, originário do

multiplicador de elétrons, é recebido e amplificado por um sistema eletrônico e então enviado a um sistema de aquisição de dados para visualização "on-line" e posterior processamento.

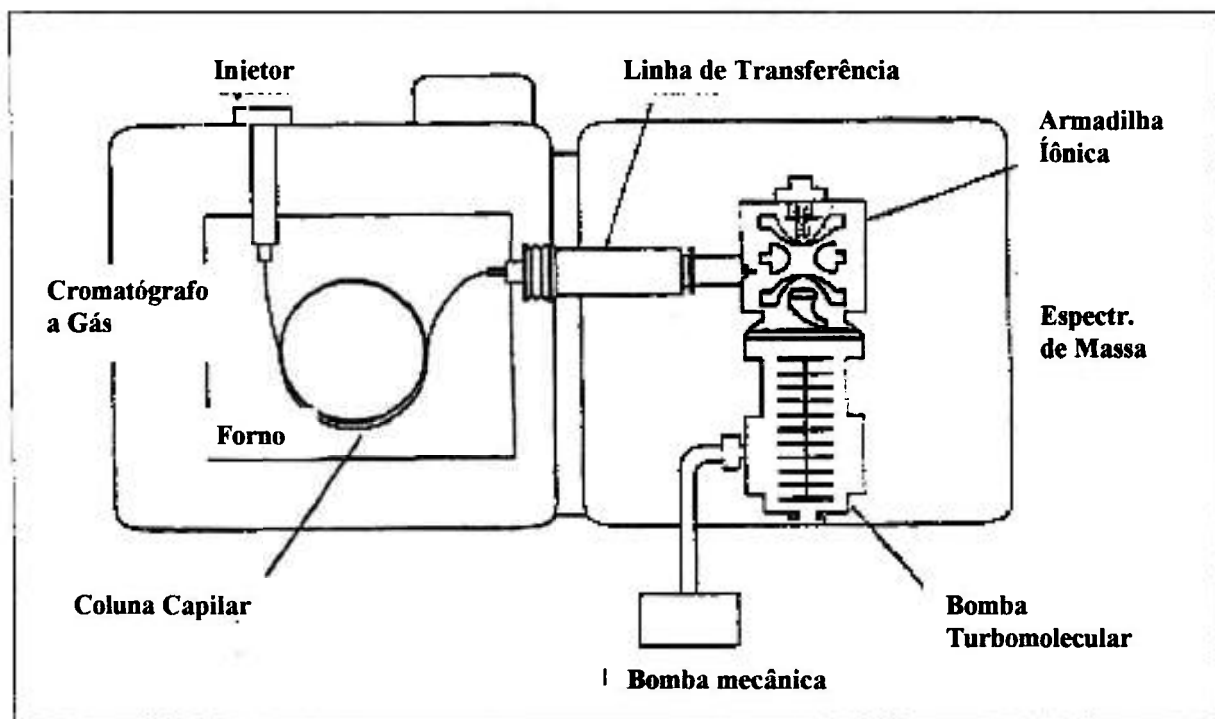


Figura 5. Principais componentes do sistema GC/MS – Saturn 3-Varian.

III. 2. O espectrômetro de massas quadrupolar

Em espectrometria de massas existem dois tipos de instrumentos quadrupolares: no primeiro, um campo bidimensional quadrupolar é estabelecido, denominado filtro de massa quadrupolar, e no segundo um campo tridimensional quadrupolar é estabelecido denominado armadilha iônica quadrupolar ou "Ion-Trap".

A Figura 6 apresenta graficamente a transformação física de um filtro de massa quadrupolar para um do tipo armadilha de íons "Ion-Trap".

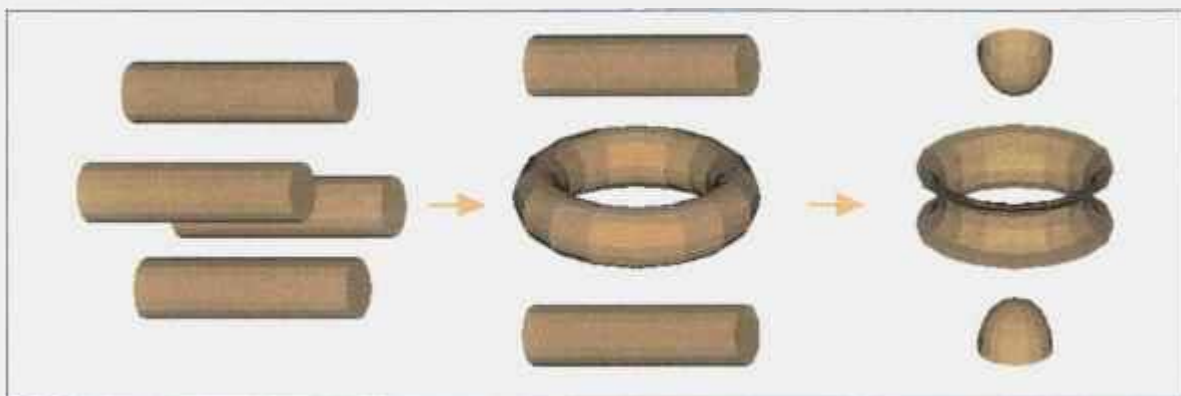


Figura 6. Transformação física de um quadrupolo bidimensional denominado Filtro de Massa para um quadrupolo tridimensional denominado Armadilha de Íons ou "Ion Trap".

A teoria a seguir é aplicável tanto a filtros de massa quanto a instrumentos de armadilha iônica sendo cada caso diferenciado em relação às condições de contorno e geometria dos eletrodos.

III. 2-1. A armadilha iônica quadrupolar

A armadilha iônica quadrupolar, "Ion Trap", é um dispositivo extraordinário que funciona tanto como uma armadilha de íons, na qual podem ser aprisionados íons gasosos por um período de tempo, como um espectrômetro de massas de intervalo de massas considerável e com resolução de massas variável; todos estes efeitos a uma pressão de 1 mTorr de gás Hélio. Funcionando como um dispositivo de armazenamento de íons, o "Ion Trap" atua como um "Tubo de ensaio elétrico", confinando íons gasosos com cargas positivas ou negativas, na ausência de solventes. A capacidade de funcionar como um "Tubo de ensaio elétrico" de campo elétrico surge da formação de um poço potencial aprisionador, quando são aplicados potenciais apropriados aos eletrodos da armadilha iônica. O aprisionamento de íons gasosos permite o estudo da química de íons na fase gasosa e leva a elucidação das estruturas dos íons pelo uso de fases repetidas de seleção de massas conhecida, como ocorre na espectrometria de massas "Tandem". Com o advento de métodos novos pelos quais íons podem ser formados por intermédio de moléculas polares ou covalentes na fase gasosa e introduzidos subsequente na armadilha iônica, o alcance de aplicações da armadilha iônica quadrupolar expandiu-se [51]. No entanto, nos limitaremos ao comportamento da armadilha de iônica de quadrupolo no que concerne aos métodos de ionização.

Além do aprisionamento de íons, a armadilha iônica funciona como um espectrômetro de massas no qual podem ser medidas as relações de massa/carga da espécie de íon confinada. A ejeção de íons do poço potencial é realizada através do aumento linear da amplitude do potencial de radiofrequência (RF) aplicada a um dos eletrodos da armadilha iônica. Cada espécie iônica é ejetada do poço potencial por meio de uma amplitude de RF específica. Através do conhecimento da amplitude inicial e da taxa de rampeamento, a relação de massa/carga pode ser determinada para cada espécie iônica ejetada. Este método para medir relações de massa/carga de íons confinados, o qual é conhecido como o modo de instabilidade axial seletiva de massas, tornou possível a comercialização da armadilha iônica quadrupolar. Um pré-requisito deste método de ejeção seletiva de massas iônicas pressupõe que os íons estejam agrupados inicialmente no centro da armadilha iônica sob a ação de colisões que dissipem *momentum*. Para este propósito são utilizados átomos de hélio.

A união da cromatografia líquida (CL) com ionização por eletro-spray (ES) e com espectrometria de massa (MS) no começo dos anos 80, juntamente com o rápido avanço em tecnologia de armadilha iônica, tem levado ao desenvolvimento de novos instrumentos de armadilha iônica para a análise de compostos não-voláteis, polares e termicamente marcados. Em 1995, novos instrumentos de armadilha iônica (o LCQ e GCQ da Finnigan, e o Escudeiro da Bruker-Franzen) foram introduzidos. Estes instrumentos empregam fontes de íons externas com injeção de íons gerados externamente dentro da armadilha iônica. O objetivo principal para a aplicação destes novos instrumentos utilizando-se CL/ES/MS, tem sido a análise de biopolímeros de alto peso molecular tais como proteínas, peptídeos, e oligo-desoxiribonucleotídeos. Estes instrumentos diferem de alguma forma no tamanho do eletrodo, separação dos eletrodos, frequência diretora e razão de varredura de massa dos instrumentos de GC/MS comuns.

O fato de que a teoria básica de operação dos dispositivos de quadrupolo tenha sido enunciada por volta de 100 anos antes da armadilha iônica quadrupolar e do filtro de massa quadrupolar tivessem sido inventados por Paul e Steinwedel [52] é um brilhante exemplo do valor inerente da saudável pesquisa básica. O trabalho pioneiro dos inventores foi reconhecido pela conquista do Prêmio Nobel de 1989 em Física para Wolfgang Paul [53].

III. 2-2. A estrutura da armadilha iônica quadrupolar

A armadilha iônica quadrupolar consiste essencialmente de três eletrodos de formato bastante peculiar os quais são mostrados na Figura 7.

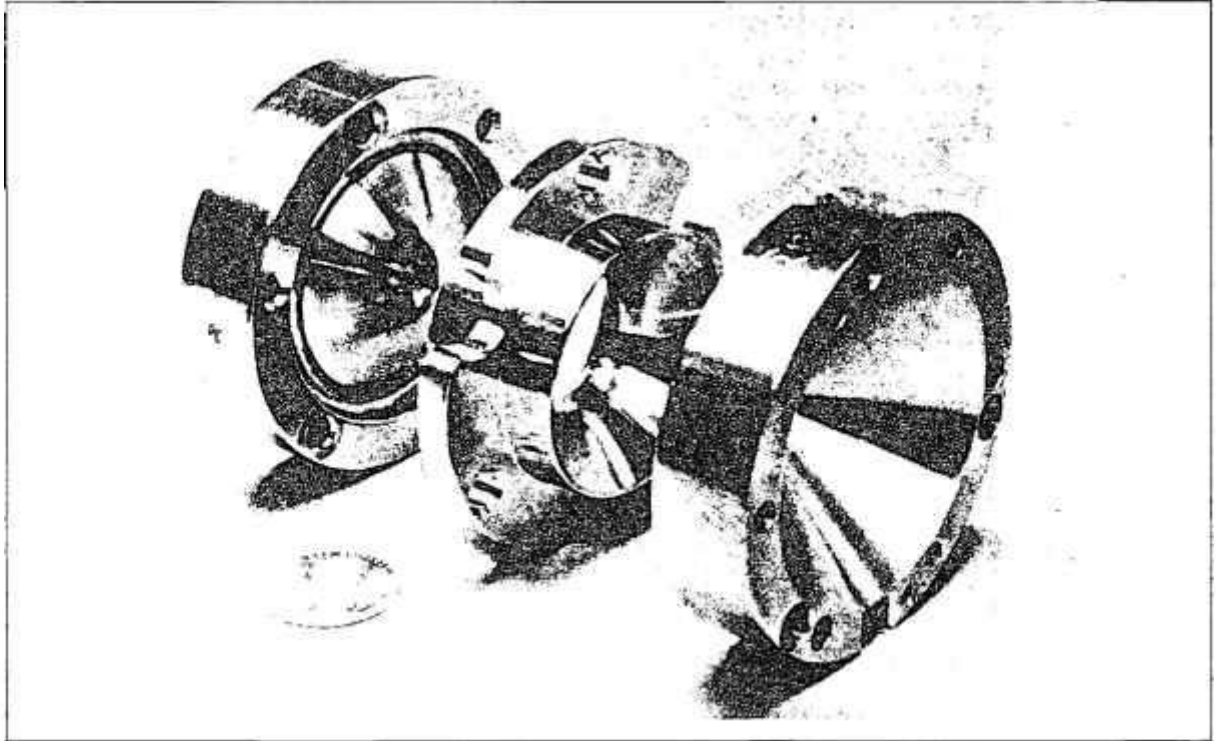


Figura 7. Os três eletrodos do quadrupolo de armadilha iônica.

Dois dos três eletrodos são virtualmente idênticos e como possuem geometria hiperbólica, se assemelham a pequenos saleiros invertidos. Estes saleiros são chamados eletrodos-tampa e na Figura 7 são distinguíveis pelo número de buracos no centro de cada eletrodo. O eletrodo-tampa superior tem uma pequena abertura central única pela qual os íons e/ou elétrons podem atravessar periodicamente. O eletrodo-tampa inferior tem várias aberturas pequenas distribuídas centralmente e pelas quais os íons alcançam um detector. Em instrumentos de armadilha iônica com fontes de íons externas, cada eletrodo-tampa tem uma única perfuração. O terceiro eletrodo também é de geometria de hiperbolóide, neste caso de duas folhas, e é chamado de eletrodo anel e se assemelha a um toróide. O eletrodo anel é posicionado simetricamente entre dois eletrodos tampa como mostrado na Figura 7. Observa-se na Figura 8 uma fotografia de uma armadilha iônica seccionada ao meio ao longo do eixo de simetria cilíndrica enquanto a Figura 9 é uma secção transversal de uma armadilha iônica ideal mostrando as assíntotas e as dimensões r_0 e z_0 , onde r_0 é o

raio do eletrodo anel no plano central horizontal e $2z_0$ é a separação dos eletrodos tampa medida ao longo do eixo da armadilha iônica.

Os eletrodos nas Figuras 8 e 9 são truncados por propósitos práticos mas teoricamente eles se estendem ao infinito e se encontram com as assíntotas mostradas na figura. As assíntotas surgem da geometria hiperbólica dos três eletrodos e, no caso ideal, são inclinadas de um ângulo de $53^{\circ} 34'$ relativamente ao eixo cilíndrico (eixo z) do conjunto de eletrodos. A geometria dos eletrodos é definida de tal forma a produzir um campo de quadrupolo ideal o qual, por sua vez, produzirá um poço potencial parabólico para confinamento de íons. O poço potencial é criado pelo campo que existe quando um potencial de RF é aplicado ao eletrodo anel e os dois eletrodos tampa estão aterrados. Porém, como mostrado na Figura 10, o poço de potencial na direção axial tem profundidade \bar{D}_z enquanto que na direção radial a profundidade é \bar{D}_r ; o valor de \bar{D}_z é por volta de duas vezes o de \bar{D}_r , de tal forma que o poço potencial se assemelha mais a um vaso de flores do que a uma tigela.

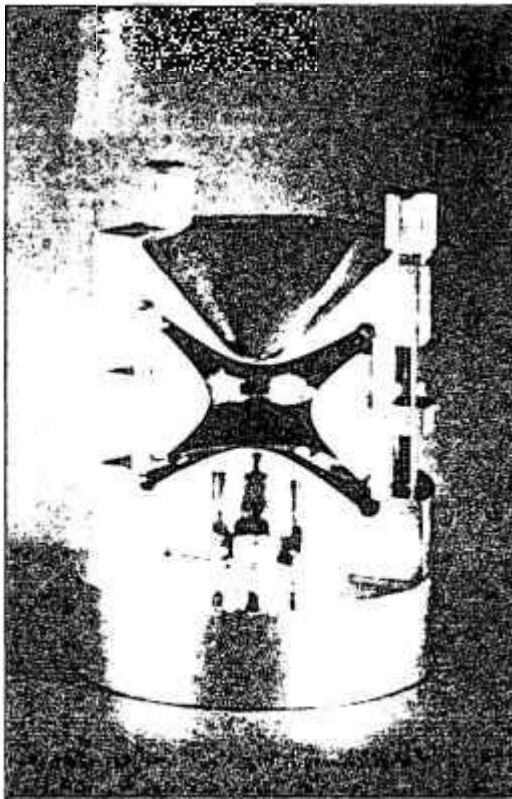


Figura 8. Armadilha iônica quadrupolar; fotografia de um corte de uma armadilha iônica ao longo do eixo de simetria cilíndrica.

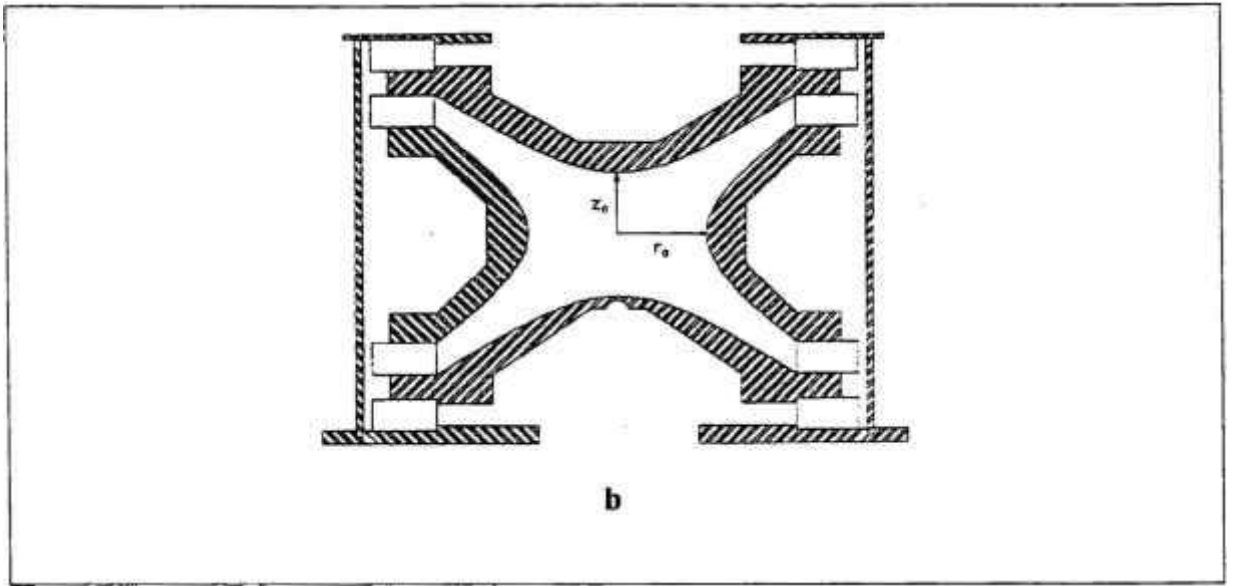


Figura 9. Armadilha iônica quadrupolar; um diagrama esquemático de uma armadilha iônica tridimensional ideal mostrando as assíntotas e as dimensões r_0 e z_0 .

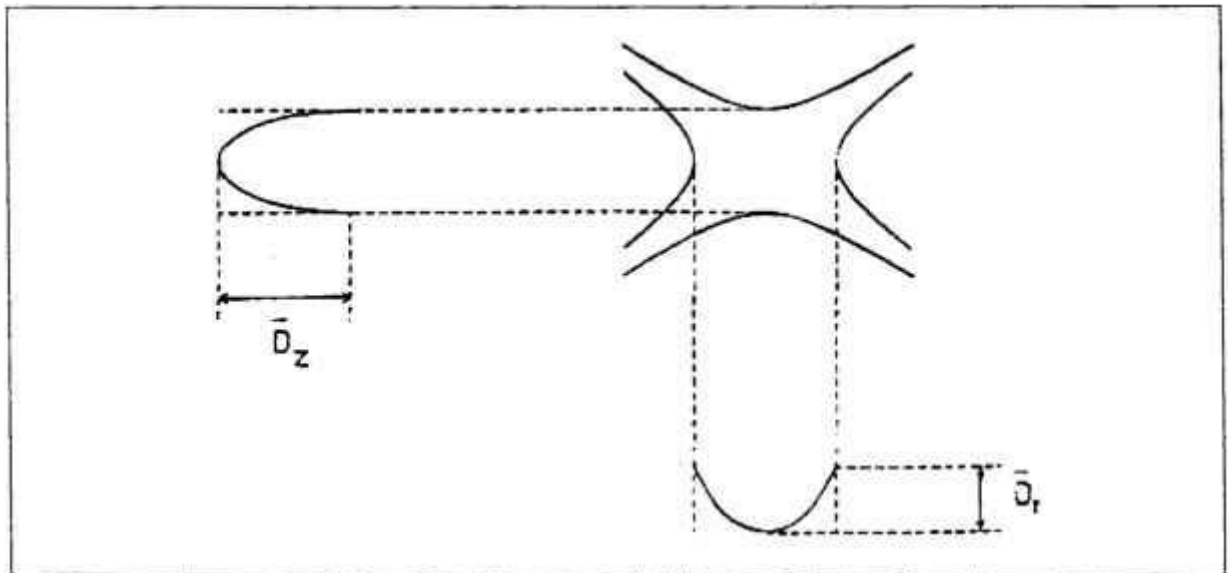


Figura 10. Representação dos poços de potencial aprisionadores parabólicos \bar{D}_z e \bar{D}_r

Para um campo de quadrupolo ideal, a seguinte identidade é estabelecida

$$r_0^2 = 2z_0^2 \quad (3.1)$$

de tal forma que uma vez estabelecida a magnitude de r_0 , as dimensões dos três eletrodos e o espaçamento entre os mesmos são fixados. No entanto tem sido alertado que,

contrariamente à equação (3.1), a razão $z_0^2 : r_0^2$ não é necessariamente restrita a 2. Desconsiderando o valor desta razão, as dimensões da armadilha iônica são largamente determinadas pela magnitude de r_0 e, na maioria das armadilhas iônicas usadas comercialmente, r_0 pode ter os valores 1,000 ou 0,707 cm.

III. 2-3. A teoria de operação da armadilha iônica

Os movimentos dos íons num aparato quadrupolar diferem totalmente das linhas retas e curvas dos íons em regiões livres de campos e em setores magnéticos e eletrostáticos respectivamente, fato este familiar àqueles que conhecem espectrômetros de massas setoriais. As armadilhas iônicas quadrupolares e os filtros de massa quadrupolares ou analisadores são descritos como instrumentos *dinâmicos* visto que as trajetórias iônicas destes instrumentos são influenciados por um conjunto de forças dependentes do tempo o que acarreta trajetórias mais difíceis de prever matematicamente, comparativamente a instrumentos setoriais. Instrumentos setoriais são descritos como instrumentos *estáticos* nos quais o campo é mantido em um valor constante para a transmissão do íon. Em instrumentos quadrupolares, um campo de quadrupolo é estabelecido quando um potencial é aplicado a eletrodos que tem uma geometria na forma hiperbólica. Devemos procurar por uma teoria de movimento iônico que leve em conta o movimento de partículas carregadas num campo de quadrupolo mas, inicialmente consideremos as forças atuando num único íon dentro de um campo quadrupolar.

II. 2-4. Um íon num campo quadrupolar

Um íon num campo de quadrupolo experimenta uma forte focalização na força de restauração a qual direciona o íon de volta ao centro do aparato, aumentando a medida que o íon se desvia do centro do aparato. A busca por uma teoria de movimento iônico não é das mais longas na medida em que tem sido observado que o movimento de íons num campo de quadrupolo pode ser descrito matematicamente pelas soluções das equações diferenciais de segunda ordem descrita originalmente por Emille Mathieu no ano de 1868 [54]; esta equação é conhecida como equação de Mathieu. Pela investigação de Mathieu sobre a vibração de membranas tensionadas, foi possível descrever soluções em termos de regiões de estabilidade e instabilidade. É possível aplicar estas soluções e idéias de estabilidade e instabilidade na descrição das trajetórias de íons confinados em aparelhos

quadrupolares e definir limites para a estabilidade das trajetórias. No intuito de adotar as soluções da equação de Mathieu devemos verificar se a equação de movimento de íons confinados num aparelho quadrupolar pode ser descrita pela equação de Mathieu. O caminho que seguiremos será o necessário para obtenção da expressão para força (massa x aceleração) na equação de Mathieu. Esta expressão será comparada com aquela para a força de um íon num campo de quadrupolo. Esta comparação, escrita abaixo em termos matemáticos permite que expressemos as magnitudes e frequências dos potenciais aplicados nos eletrodos da armadilha iônica, as dimensões da armadilha iônica e as razões massa/carga de íons confinados, em termos dos parâmetros adimensionais a_u e q_u da equação de Mathieu. Como base, adotar-se-á a idéia das regiões de estabilidade no espaço a_u e q_u com o intuito de discutirem-se o confinamento e os limites dos íons gasosos nos aparatos de quadrupolo.

III. 2-5. A equação de Mathieu

A forma canônica de equação de Mathieu é:

$$\frac{d^2 u}{d \xi^2} + (a_u - 2 q_u \cos 2 \xi) u = 0 \quad (3.2)$$

onde u representa os eixos coordenados x , y e z ; ξ é um parâmetro adimensional igual a $\Omega t/2$ onde Ω é a frequência e t o tempo; e a_u e q_u parâmetros adimensionais adicionais conhecidos como parâmetros aprisionadores. A introdução de Ω não é de todo sem propósito desde que o mesmo reaparece como frequência radial (em rad/s) do potencial RF aplicado ao eletrodo anel. Pode ser mostrado que substituindo $\xi = \Omega t/2$ da Equação (3.2) teremos que

$$\frac{d^2 u}{dt^2} = \frac{\Omega^2}{4} \frac{d^2 u}{d \xi^2} \quad (3.3)$$

Substituindo a Equação (3.3) na Equação (3.2), substituindo Ωt por 2ξ , multiplicando todos os termos por m e re-arranjando a equação leva a:

$$m \frac{d^2 u}{dt^2} = \frac{-m\Omega^2}{4} (a_u - 2q_u \cos \Omega t) u \quad (3.4)$$

Notamos que o lado esquerdo da Equação (3.4) pode representar a força de um íon, isto é, massa vezes aceleração em cada uma das direções x , y e z .

Cabe observar que o campo, nos aparelhos quadrupolares, é não-acoplado de tal forma que as forças nas três direções coordenadas podem ser determinadas separadamente. Consideremos a força na direção x , isto é F_x , experimentada por um íon de massa m e carga e em qualquer ponto dentro do campo quadrupolar dada pela expressão:

$$F_x = ma = m \frac{d^2 x}{dt^2} = -e \frac{\partial \phi}{\partial x} \quad (3.5)$$

Onde a é aceleração do íon, e é a carga eletrônica e ϕ é o potencial em qualquer ponto (x,y,z) dentro do campo. Similarmente, as expressões para F_y e F_z podem ser obtidas. Deve-se observar que a Equação (3.5) relaciona a força no íon com o campo, dentro da armadilha iônica. O potencial quadrupolar ϕ pode ser expresso como

$$\phi = \frac{\phi_0}{r_0^2} (\lambda x^2 + \sigma y^2 + \gamma z^2) \quad (3.6)$$

onde ϕ_0 é o potencial elétrico aplicado (o qual, como veremos mais tarde, é um potencial RF único ou em combinação com um potencial de corrente contínua), λ , σ e γ são grandezas constantes para as coordenadas x , y e z respectivamente, e r_0 é uma constante que é definida separadamente dependendo se o aparelho quadrupolar é uma armadilha iônica ou um filtro de massas. Pode ser visto pela Equação (3.6) que o potencial aumenta quadraticamente com x , y e z . Em qualquer campo elétrico é essencial que a condição de Laplace, que requer que o segundo diferencial do potencial num ponto seja igual a zero, seja satisfeita; a condição de Laplace assegura que o campo nas direções x , y e z é linear e não muda. Quando isto é feito, verifica-se que

$$\lambda + \sigma + \gamma = 0 \quad (3.7)$$

Para a armadilha iônica temos $\gamma = \sigma = 1$ e $\lambda = -2$, enquanto que para o filtro de massa quadrupolar $\lambda = \sigma = 1$ e $\gamma = 0$. Substituindo os valores de $\gamma = \sigma = 1$ e $\lambda = -2$ na Equação

(3.6) se obtém para o potencial em qualquer ponto dentro do campo de quadrupolo na armadilha iônica quadrupolar a seguinte expressão:

$$\phi_{x,y,z} = \frac{\phi_0}{r_0^2} (x^2 + y^2 - 2z^2) \quad (3.8)$$

Esta equação pode ser transformada em coordenadas cilíndricas, pelo emprego das transformações padrão $x = r \cos \theta$, $y = r \sin \theta$, $z = z$. Então a Equação (3.8) torna-se:

$$\phi_{r,z} = \frac{\phi_0}{r_0^2} (r^2 \cos^2 \theta + r^2 \sin^2 \theta - 2z^2) \quad (3.9)$$

Quando aplicamos a identidade trigonométrica $\cos^2 \theta + \sin^2 \theta = 1$, obtemos

$$\phi_{r,z} = \frac{\phi_0}{r_0^2} (r^2 - 2z^2) \quad (3.10)$$

O potencial elétrico ϕ_0 , aplicado ao eletrodo anel pode ser um potencial de RF, $V \cos \Omega t$, ou uma combinação deste com um potencial de corrente contínua U , da forma

$$\phi_0 = U + V \cos \Omega t \quad (3.11)$$

onde Ω é a frequência angular em rad/s do campo RF. Note que Ω é igual a $2\pi f$ onde f é a frequência em Hertz.

Quando as expressões para ϕ_0 , dadas na Equação (3.11) e $\lambda = 1$ são substituídas na Equação (3.6) e ϕ é diferenciado com respeito a x , obtemos a seguinte expressão para o gradiente de potencial:

$$\frac{\partial \phi}{\partial x} = \frac{2x}{r_0^2} (U + V \cos \Omega t) \quad (3.12)$$

Substituindo a Equação (3.12) na Equação (3.5) produz-se uma expressão para a força de um íon

$$m \frac{d^2 x}{dt^2} = \frac{-2e}{r_0^2} (U + V \cos \Omega t) x \quad (3.13)$$

Pode-se comparar diretamente os termos do lado direito das Equações (3.4) e (3.13), lembrando que u representa x obtendo:

$$a_x = \frac{8eU}{mr_o^2\Omega^2}; \quad q_x = \frac{-4eV}{mr_o^2\Omega^2} \quad (3.14)$$

Quando esta derivação é repetida para a obtenção da força num íon na direção y , obtemos $q_x = -q_y$; esta relação é obtida desde que $\lambda = \sigma = -1$. Para a armadilha iônica quadrupolar verifica-se que $q_x = q_y$; esta igualdade é encontrada desde que $\lambda = \sigma = 1$ e $\gamma = -2$.

$$a_z = \frac{-8eU}{mr_o^2\Omega^2}; \quad q_z = \frac{4eV}{mr_o^2\Omega^2} \quad (3.15)$$

Ignorando a_z (que é proporcional a U , isto é, um potencial CC) inicialmente, visto que muitos dos instrumentos de armadilhas iônicas comerciais não oferecem a flexibilidade de aplicação de um potencial CC aos eletrodos; desta forma a_z é igual a zero, o que corresponde ao modo mais comum de operação da armadilha iônica correspondente a operação no eixo q_z . A expressão de q_z na Equação (3.15) contém a razão massa/carga para um dado íon, as dimensões da armadilha iônica, r_o , a amplitude V do potencial de RF e a frequência radial Ω , isto é, todos os parâmetros necessários para o entendimento das varias operações da armadilha iônica. As soluções da equação de Mathieu são agora acessíveis e podem ser interpretadas em termos de estabilidade de trajetórias (e instabilidade) em cada uma das direções x , y (ou r) e z , do confinamento quando as condições correspondem simultaneamente a trajetórias estáveis em mais de uma direção, e a trajetórias características tais como as frequências seculares fundamentais do movimento iônico nas direções radial (r) e axial (z).

III. 2-6. Os potenciais nos eletrodos

Pode-se agora verificar os potenciais no eletrodo anel e eletrodos-tampa da seguinte maneira, com referência a Figura 9b e a Equação 3.10. Considere a intersecção do plano radial central com a superfície do eletrodo anel onde $z = 0$ e $r = r_o$; o potencial no eletrodo-anel é dado por :

$$\phi_{r_o,0} = \frac{\phi_o}{r_o^2} r_o^2 = \phi_o \quad (3.16)$$

Considere a intersecção do eixo central com simetria cilíndrica com a superfície dos eletrodos tampa onde $r = 0$ e $z = z_0$. Reconsiderando a identidade da Equação (3.1) e o potencial da Equação (3.10), o potencial de cada eletrodo de tampa é dado por:

$$\phi_{r_0,0} = \frac{\phi_0}{r_0^2} r_0^2 = \phi_0 \quad (3.17)$$

No entanto, nenhuma armadilha iônica quadrupolar opera desta maneira, pelo contrário, os eletrodos tampa são mantidos num potencial de aterramento exceto pela imposição de potenciais oscilantes de baixa amplitude, de centenas de milivolts a poucos volts. A aplicação de ϕ ao eletrodo anel e aos eletrodos de tampa aterrados, acarreta no corte, pela metade, do intervalo de massas da armadilha iônica, como um espectrômetro de massa.

Com o objetivo de verificar os potenciais do eletrodo-anel e eletrodos-tampa em armadilhas iônicas comerciais, uma equação alternativa para a Equação (3.10) deve ser usada; esta equação é:

$$\phi_{r,z} = \frac{\phi_0 (r^2 - 2z^2)}{2r_0^2} + c \quad (3.18)$$

onde c é uma constante. O potencial do eletrodo-anel (Equação 3.18 com $z = 0$, $r = r_0$) é dada por:

$$\phi_{r_0,0} = \frac{\phi_0 r_0^2}{2r_0^2} + c = \phi_0 \quad (3.19)$$

pela qual obtemos $c = \phi_0 / 2$. O potencial nos eletrodos-tampa ($r = 0$ e $z = z_0$) é dado por:

$$\phi_{0,z_0} = \frac{-2\phi_0 z_0^2}{2r_0^2} + \frac{\phi_0}{2} = 0 \quad (3.20)$$

Então a equação 3.18 se reduz a:

$$\phi_{r,z} = \frac{\phi_0 (r^2 - 2z^2)}{2r_0^2} + \frac{\phi_0}{2} \quad (3.21)$$

Os termos constantes não mudam as equações de movimento, derivadas de diferenciais parciais, mas os potenciais ao longo das assíntotas das hipérbolas são mudados. Deve ser observado que um íon no centro de uma armadilha iônica comercial experimenta um potencial $\phi_0/2$ e "vê" um potencial $-\phi_0/2$ nos eletrodos-tampa e um potencial $\phi_0/2$ no eletrodo-anel.

III. 2-7. A armadilha iônica "esticada"

Como foi discutido acima, os eletrodos da armadilha iônica são truncados de forma a obter um instrumento de trabalho prático, mas esta truncagem introduz componentes de multipolo como mostrado na Equação (3.22)

$$\begin{aligned} \phi_{r,z} = & C_0^o + C_1^o z + C_2^o \left(\frac{1}{2} r^2 - z^2 \right) + C_3^o z \left(\frac{3}{2} r^2 - z^2 \right) \\ & + C_4^o \left(\frac{3}{8} r^4 - 3 r^2 z^2 + z^4 \right) + \dots \end{aligned} \quad (3.22)$$

Os coeficientes C_n^o , onde $n = 0, 1, 2, 3$, e 4, correspondem às componentes de monopolo, dipolo, quadrupolo, hexapolo e octopolo, respectivamente, do potencial $\phi_{r,z}$. Para a armadilha iônica quadrupolar pura, somente os coeficientes correspondentes a $n = 0$ e $n = 2$ não tem o valor zero.

Para compensar estas componentes de multipolo de ordem maior, os eletrodos de aparelhos comerciais a partir de 1995 são construídos de tal forma que as distâncias entre os eletrodos-tampa tem sido aumentadas ou "esticadas"; os valores aumentaram cerca de 10,6%. No entanto não há correspondente modificação das formas dos eletrodos, o que poderia ser requerido de forma a manter uma geometria quadrupolar pura.

As conseqüências imediatas são que as assíntotas dos eletrodos-tampa não mais coincidem com àquelas do eletrodo-anel. Além disso, $r_0^2 \neq 2z_0^2$. Com intuito de compensar, em parte, o alargamento da armadilha iônica os parâmetros de aprisionamento são agora calculados usando os valores reais de z_0 e r_0 como se segue:

$$a_r = \frac{8eU}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2}; \quad q_r = \frac{-4eV}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2} \quad (3.23)$$

e

$$a_z = \frac{-16eU}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2}; \quad q_z = \frac{8eV}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2} \quad (3.24)$$

Quando $r_0^2 = 2z_0^2$ é substituído na Equação (3.24), obtêm-se os parâmetros de aprisionamento da Equação (3.15). Deve ser observado que para a armadilha iônica nos instrumentos LCQTM e GCQTM, $r_0 = 0,707$ cm e $z_0 = 0,785$ cm de tal forma que a geometria foi esticada para aproximadamente 57%.

III. 2-8. Regiões de trajetórias iônicas estáveis

A operação de armadilhas iônicas quadrupolares leva em conta o critério que governa a estabilidade e instabilidade da trajetória de um íon dentro de um campo, isto é, as condições experimentais que determinam se um íon será estocado dentro de um aparelho ou será ejetado, e dessa forma perdido ou detectado externamente.

As soluções da equação de Mathieu possuem duas formas: (i) periódica mas instável, e (ii) periódica e estável. As soluções do tipo (i) são chamadas funções de Mathieu de ordem integral e formam as fronteiras das regiões instáveis no diagrama de estabilidade. As fronteiras que são referenciadas como *curvas características* ou *valores característicos*, correspondem aos valores de um novo parâmetro de aprisionamento, β_z , que são números inteiros, isto é, 0,1,2,3,...; β_z é uma função complexa de a_z e q_z . No Apêndice deste trabalho foram calculadas as soluções da equação de Mathieu no caso particular em que $\beta = 1$. As regiões de estabilidade correspondentes a soluções estáveis da equação de Mathieu na direção z estão sombreadas e marcadas *estáveis-z* na Figura 11(a).

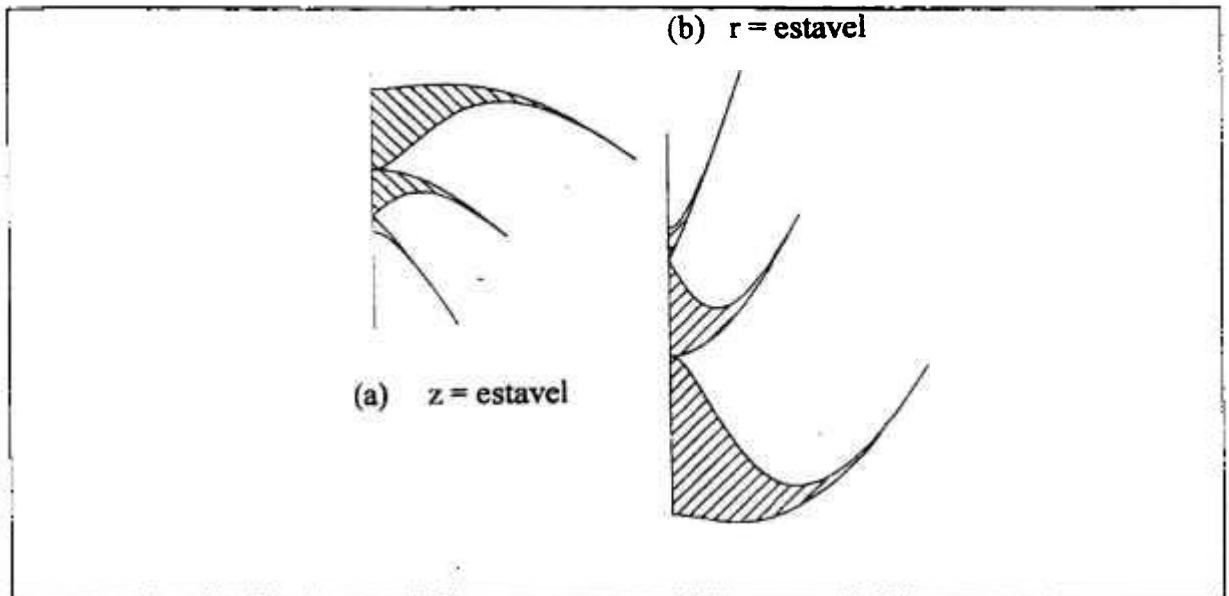


Figura 11. Várias regiões de estabilidade de Mathieu para o campo de quadrupolo tridimensional. a) diagramas para a direção z no espaço (a_z, q_z) ; b) diagramas para a direção r no espaço (a_r, q_r) .

As regiões de estabilidade correspondentes às soluções estáveis da equação de Mathieu, na direção r , estão sombreadas e marcadas como estáveis r na Figura 11(b); pode ser visto que elas são dobradas em magnitude ao longo da ordenada e invertidas. Pelas Eq. (3.23) e (3.24) pode ser visto que $a_z = -2q_z$ e $q_z = -2q_r$, isto é, os parâmetros de estabilidade para as direções r e z diferem por um fator -2 .

Os íons podem ser armazenados na armadilha iônica contanto que suas trajetórias sejam simultaneamente estáveis nas direções r e z ; tais trajetórias são obtidas na região mais próxima à origem, isto é, a região A na Figura 12 a qual é delineada graficamente no espaço (a_u, q_u) .

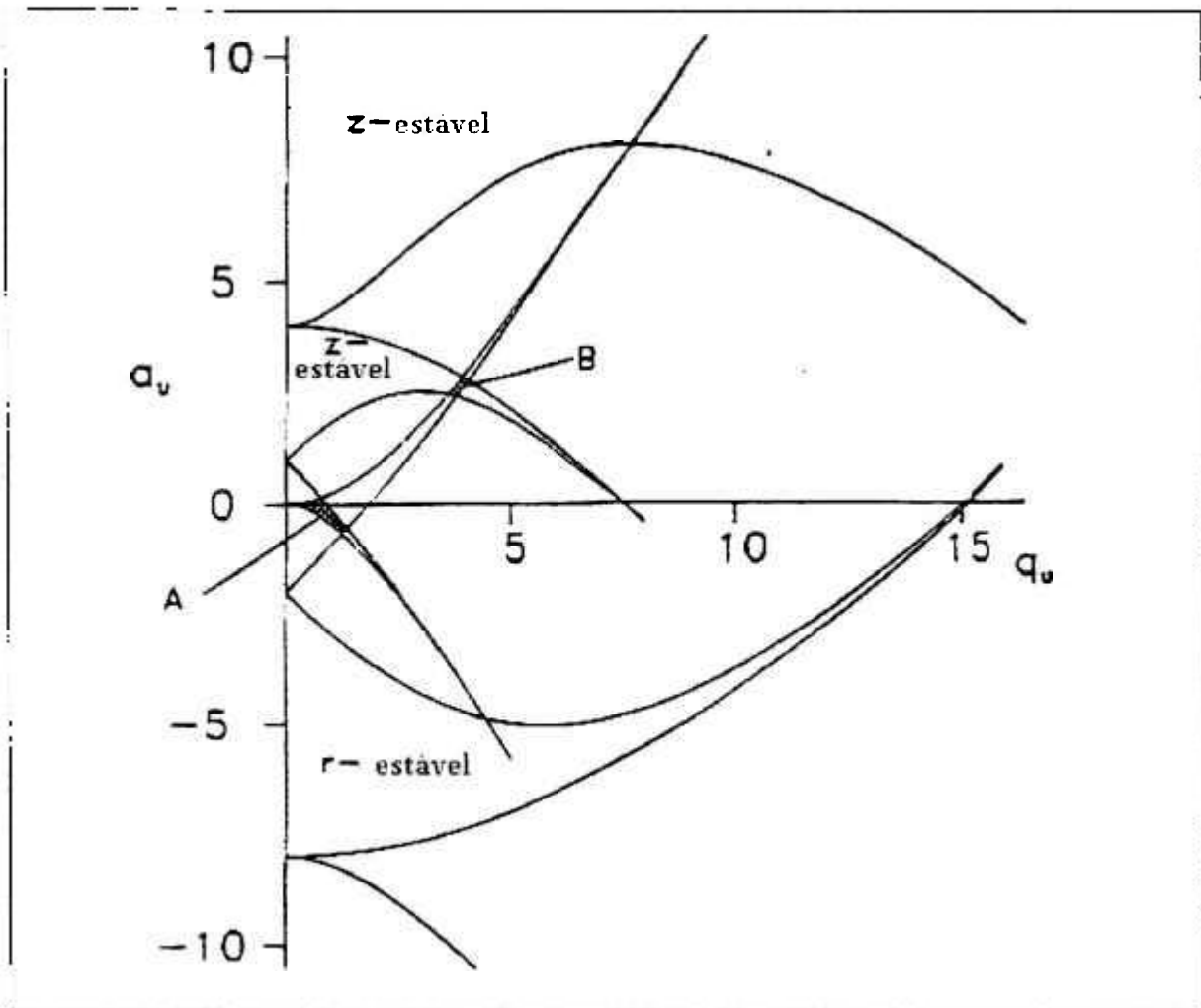


Figura 12. Diagrama de estabilidade de Mathieu no espaço (a_z, q_z) para a armadilha iônica quadrupolar em ambas as direções r e z . As regiões de sobreposição simultânea são marcadas como A e B.

As regiões A e B são referenciadas como regiões de estabilidade. A região A é a de maior importância no momento e é mostrada em maiores detalhes na Figura 13. A região B permanece por ser explorada. As coordenadas da região de estabilidade na Figura 13 são os parâmetros de Mathieu a_z e q_z . Nesta figura coloca-se a_z versus q_z visto que u é função de r e z . Na Figura 13 a fronteira de estabilidade $\beta_z = 1$ intercepta o eixo q_z em $q_z = 0,908$; este ponto de trabalho é o do íon de menor razão massa/carga (isto é, massa de corte inferior) que pode ser armazenado na armadilha iônica.

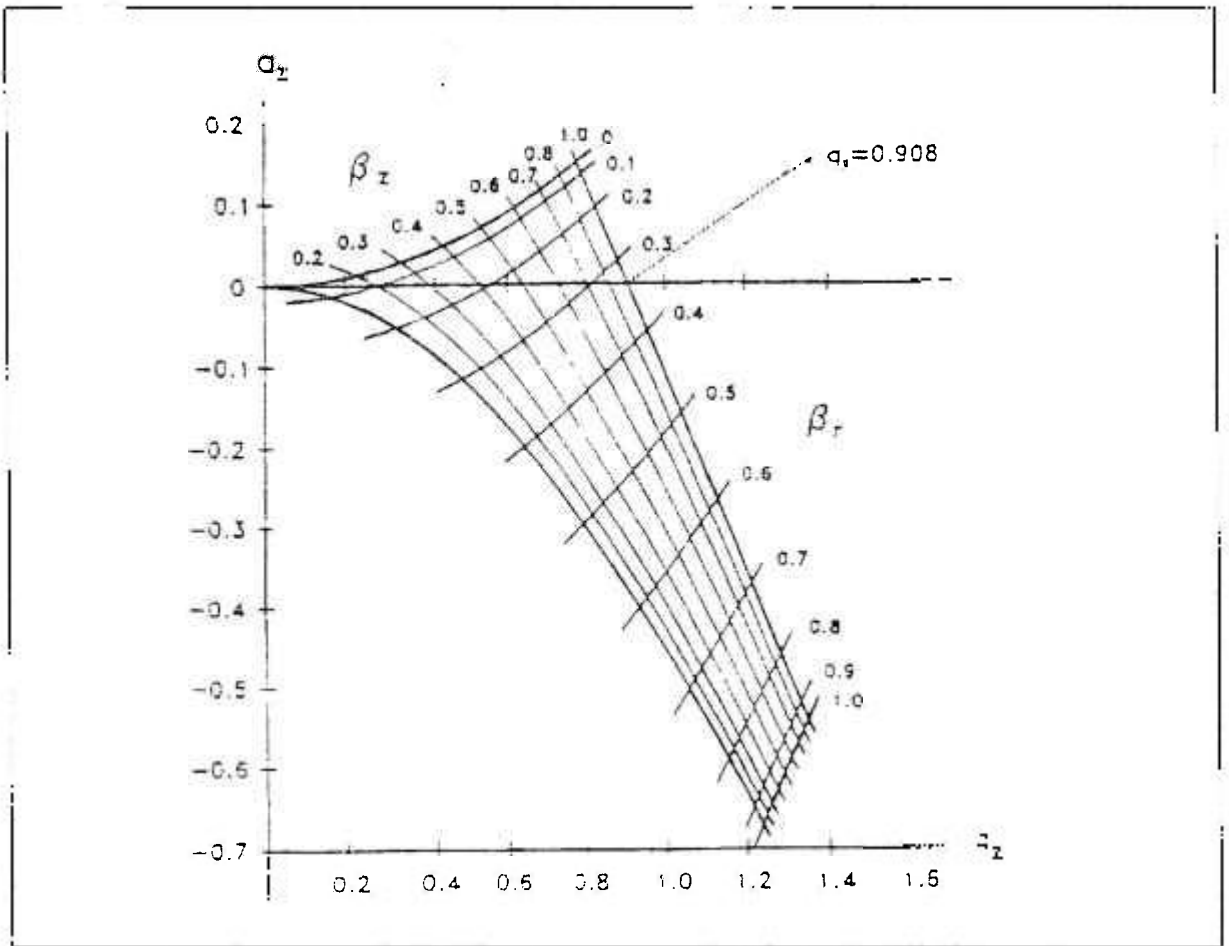


Figura 13. Diagrama de estabilidade no espaço (a_z, q_z) para a região de estabilidade simultânea em ambas as direções r e z próximo à origem para a armadilha iônica quadrupolar tridimensional; as linhas iso- β_r e iso- β_z são mostradas no diagrama. O eixo q_z intercepta a fronteira $\beta_z = 1$ em $q_z = 0,908$, o qual corresponde ao q_{max} no modo de instabilidade seletiva de massa.

III. 2-9. Freqüências seculares

Uma representação tridimensional de uma trajetória iônica, na armadilha iônica, como visto na Figura 14, tem a aparência geral de uma curva de Lissajous ou símbolo de infinito, composto de duas componentes das freqüências fundamentais $\omega_{r,0}$ e $\omega_{z,0}$ do movimento secular. A descrição *fundamental* significa que existem outras freqüências de maior ordem (n) e a família completa de freqüências é descrita por $\omega_{r,n}$ e $\omega_{z,n}$.

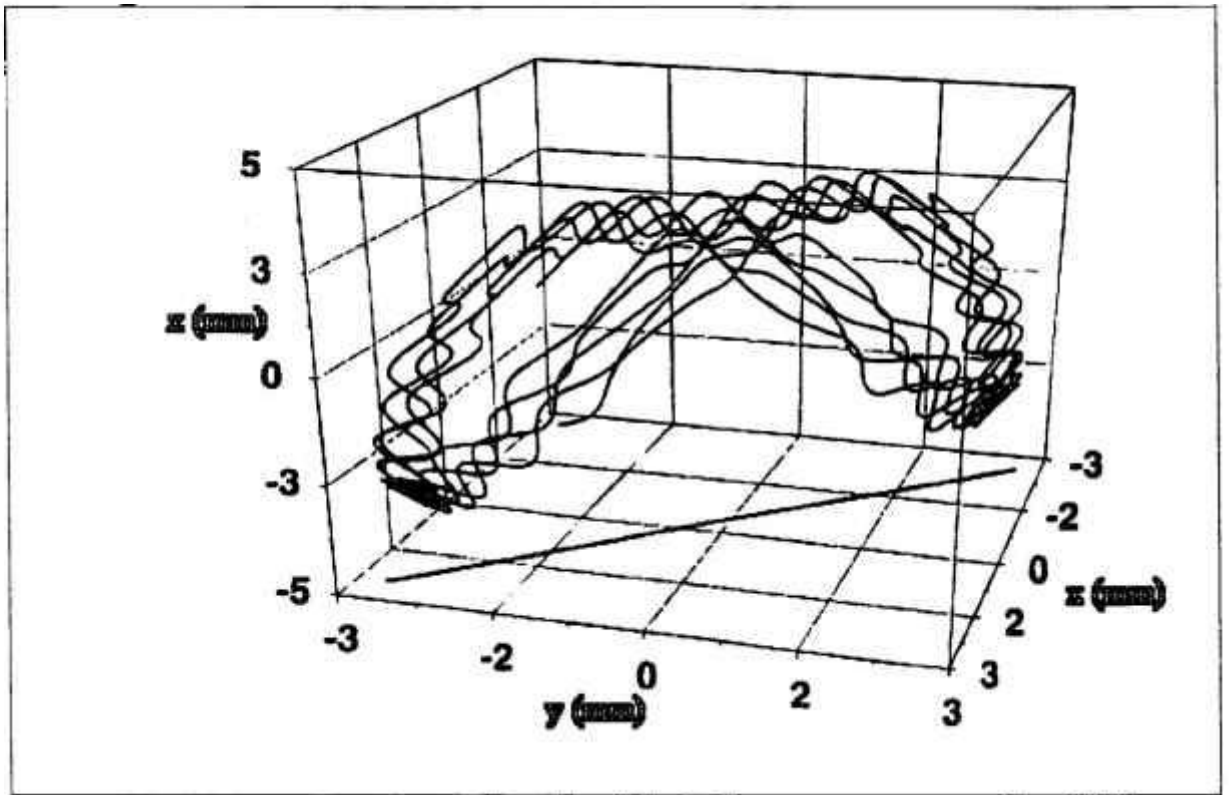


Figura 14. Trajetória de um íon aprisionado com $m/z = 105$. A posição inicial foi selecionada randomicamente de uma população com uma distribuição inicial Gaussiana; $q_z = 0,3$; velocidade inicial zero. A projeção sobre o plano x-y ilustra o movimento planar no espaço tridimensional. A trajetória desenvolve uma forma que se assemelha a um bumerangue achatado.

Estas frequências seculares são dadas por

$$\omega_{u,n} = \left(n + \frac{1}{2} \beta_u\right) \Omega, \quad 0 \leq n < \infty \quad (3.25)$$

e

$$\omega_{u,n} = -\left(n + \frac{1}{2} \beta_u\right) \Omega, \quad -\infty < n < 0 \quad (3.26)$$

onde

$$\beta_u \approx \sqrt{\left(a_u + \frac{q_u^2}{2} \right)} \quad (3.27)$$

para $q_r < 0,2$ e $q_z < 0,4$. Deve ser observado que enquanto a frequência secular axial fundamental, $\omega_{z,0}$, é usualmente dada em unidades de Hertz na literatura e referida simplesmente como ω_z , a mesma deveria ser dada em rad/s. Até este momento, as frequências de ordens mais altas são de pequena significância prática.

O movimento oscilatório do íon é resultado das ondulações na superfície potencial que pode ser visualizada como a rotação da superfície potencial (Figura 15).

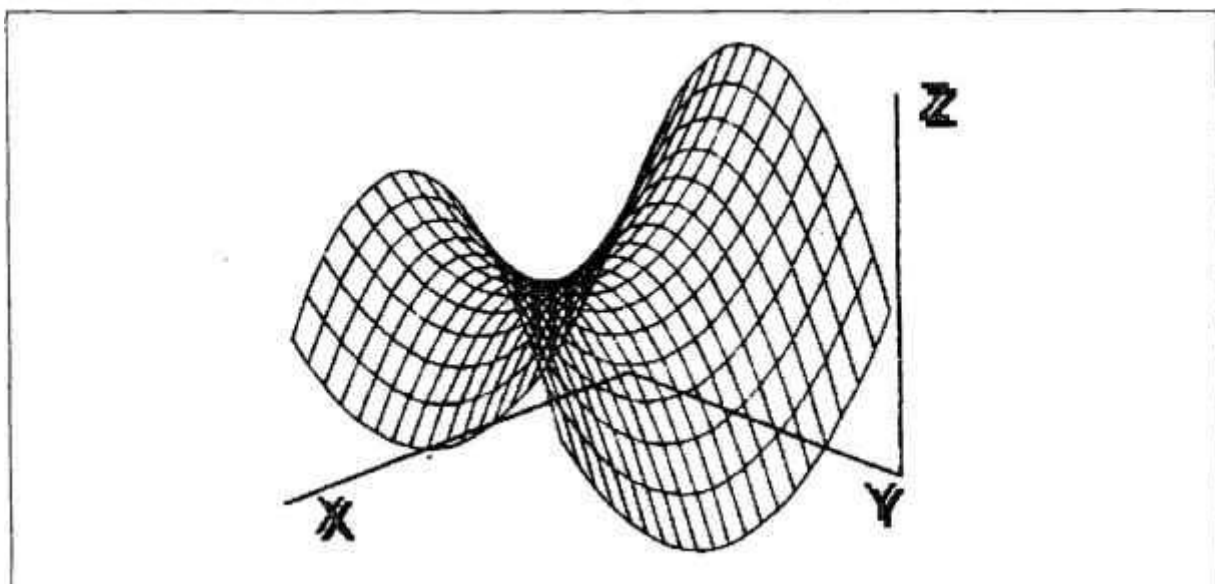


Figura 15. Campo de quadrupolo puro, ou superfície de potencial, para a armadilha iônica quadrupolar.

III. 2-10. Excitação ressonante

Da mesma forma que o movimento de íons confinados em uma armadilha iônica quadrupolar é caracterizado por duas frequências seculares, axial e radial, o movimento do íon pode sofrer excitação por irradiação ressonante por uma das frequências citadas ou ambas [55]. Tal irradiação pode ser efetivada pela aplicação de um pequeno potencial oscilatório suplementar de algumas centenas de milivolts através dos eletrodos tampa, isto é, no modo dipolar. A excitação ressonante, que utiliza frequências seculares axiais de íons confinados, tem se transformado numa poderosa técnica na espectrometria de massa de armadilha iônica quadrupolar devido a utilização de formas de onda pré

determinadas de frequências específicas ou intervalos de frequência. Anteriormente à excitação ressonante das trajetórias iônicas, os íons são focalizados em direção às vizinhanças do centro da armadilha iônica sob a influência de colisões com um fluxo de átomos de gás hélio. Este processo é descrito como *esfriamento iônico* no qual a energia cinética dos íons é reduzida a aproximadamente 0,1 eV, correspondente a aproximadamente 800 ⁰K como calculado por $3RT/2 = 0,1 \text{ eV}$. O distanciamento dos íons com respeito ao centro da armadilha iônica é menor do que 1 mm.

A excitação ressonante de íons resfriados sob a influência de um potencial oscilante suplementar, da frequência secular axial de uma espécie iônica específica e com amplitude de umas poucas centenas de milivolts faz com que estes íons se movam para longe do centro da armadilha iônica, de tal forma a experimentarem um forte campo de aprisionamento. Este processo de excitação iônica é frequentemente referido como *cócegas* ou "tickling". Os íons sofrem uma aceleração adicional devida ao campo de aprisionamento de tal forma a adquirirem energias cinéticas de dezenas de elétron-volts [56].

A excitação ressonante é utilizada de várias formas: (i) Para remover íons durante a ionização de forma a isolar um intervalo estreito de razões massa/carga; neste caso, frequências de bandas de onda são aplicadas aos eletrodos-tampa de maneira a excitar e ejetar muitas espécies iônicas simultaneamente, deixando uma única espécie iônica ou um pequeno intervalo de razões massa/carga isolado dentro da armadilha iônica. (ii) Para aumentar a energia cinética iônica promovendo reações íon/molécula endotérmicas. (iii) Para aumentar a energia cinética de forma a depositar energia interna em íons através de colisões com troca de *momentum* com átomos de Hélio que, no limite, dissociam íons. (iv) Para aumentar a energia cinética de forma a movimentar íons para a proximidade do eletrodo tampa onde uma corrente imagem possa ser detectada. Este modo permite uma mensuração não destrutiva e uma nova mensuração das razões massa/carga dos íons confinados. (v) Para aumentar a energia cinética de forma a causar o escape de íons do potencial aprisionador e desta forma causar a ejeção dos mesmos. Este modo pode ser usado tanto para a ejeção de íons desnecessários como no isolamento de íons ou para ejeção de íons seletivamente selecionados quando a frequência aplicada é varrida. (vi) Para ejetar íons quando a amplitude V da RF é rampeada. Este modo, conhecido como modulação axial, é usado em conjunto com o rampeamento de RF com o intuito de levar os íons à ressonância com a frequência fixada em aproximadamente $6 V_{(p,p)}$ um pouco antes de suas trajetórias se tornarem instáveis. Neste caso, íons de pequena razão

massa/carga são removidos da influência perturbadora de íons de razões massa/carga maiores e são detectados com resolução adicional. Na modulação axial, a frequência ressonante é um pouco menos da metade da frequência principal Ω .

IV. TÉCNICAS DE OPERAÇÃO DO ESPECTRÔMETRO DE MASSA "ION-TRAP"

Neste capítulo são abordadas as técnicas de operação da espectrometria de massas "Ion-Trap" no que se refere ao sistema disponível modelo Saturn-3, marca Varian, explicitando as técnicas de ionização por impacto de elétrons (IE) e ionização química (IQ), bem como o modo de armazenagem de íons selecionados (AIS) que se constitui num caso particular de excitação ressonante. Também são abordados o controle de ganho automático (CGA) e a detecção iônica via multiplicador de elétrons.

IV. 1. Ionização por impacto de elétrons (IE)

Um método tradicional de ionização tem sido o de impacto por elétrons (IE), onde as moléculas da amostra são ionizadas por elétrons acelerados por uma diferença de potencial de usualmente 70 V. Esta técnica tem sido amplamente utilizada, sendo o espectro de massas produzido, caracterizado por um considerável grau de fragmentação do íon molecular inicialmente formado [57]. O íon molecular não necessariamente é observado, no entanto, vários íons de menor massa o são. Estes íons são formados por reações de clivagem simples ou rearranjos mais complexos. Esses dois processos introduzem um fator de dificuldade em muitos espectros de ionização por impacto, mas estes íons decompostos revelam uma considerável quantidade de informação estrutural sobre a molécula.

IV. 2. Ionização química (IQ)

Este método de criação de íons é normalmente denominado de ionização suave" quando comparada à ionização por impacto de elétrons. A Ionização Química (IQ) produz íons da amostra neutra sem depositar considerável quantidade de energia nos íons formados. Em contrapartida, a extensiva fragmentação dos íons criados no modo IE é resultante do excesso de energia interna (uma técnica de ionização "forte"). Embora os padrões de fragmentação sejam de considerável utilidade analítica, o íon molecular é de

extrema importância. No entanto, muitos dos espectros de IE contem apenas um traço do íon molecular ou o mesmo está ausente do espectro de massa observado [50]. Em oposição, os espectros de IQ fornecem, em muitos casos, um intenso íon molecular e um padrão de fragmentação muito mais simples. Na prática, um gás reagente (metano, isobutano, amônia etc.) é introduzido na armadilha iônica. O gás é então ionizado por IE e, em seguida, as moléculas da amostra são ionizadas pela interação com os íons resultantes da ionização do gás reagente. Na ionização química de íons positivos, uma das reações mais utilizadas tem sido a transferência de prótons dos íons reagentes (BH^+) para a molécula da amostra (M) (Reação 4.1), onde ΔH corresponde à diferença de protoafinidade de B menos a protoafinidade de M [58]. Para que tal reação ocorra, a mesma deve ser exotérmica (ΔH negativo). Isto implica que a protoafinidade do íon reagente (BH^+) deve ser menor que a protoafinidade da molécula de interesse M. A extensão da fragmenta-



ção do íon molecular (MH^+) será tanto maior quanto mais negativa for ΔH , a exotermicidade da reação de transferência protônica, pois mais energia será depositada como energia interna disponível para a fragmentação da molécula de interesse. A magnitude de ΔH e, em conseqüência, a extensão da fragmentação de MH^+ freqüentemente pode ser controlada pela escolha correta do gás reagente. Conceitualmente, a proto-afinidade de uma molécula pode ser entendida como a quantidade de energia liberada quando da adição de um próton a esta. Portanto, uma grande proto-afinidade significa que mais energia é liberada quando da adição de um próton e, desta forma, a adição de um próton se torna energeticamente mais favorável. Cabe salientar que as reações de transferência protônica são altamente eficientes, ocorrendo virtualmente em todas as colisões. Caso a protoafinidade do íon reagente seja maior do que a da molécula de interesse, ou seja, na medida em que a reação (4.1) se torna termoneutra, a eficiência da reação cairá e se tornará muito baixa para reações endotérmica ou endoenergéticas [51].

IV. 3. Controle de ganho automático (C.G.A)

Apesar das melhorias trazidas pelo uso do gás "buffer" (gás de arraste, que diminui a energia dos íons no interior da armadilha iônica através de choques elásticos com suas moléculas), da geometria "esticada" (Capítulo III, item 3.10) e das funções de varredura segmentadas, os primeiros espectros de massa reportados com o "Ion-Trap" mostravam significantes distorções na medida em que a concentração da amostra mudava. Claramente, estas distorções eram insatisfatórias para aplicações analíticas, onde a integridade quantitativa dos dados obtidos era essencial. Em particular, poderia haver uma significantes distorção entre o espectro de massas IE obtido com o "Ion-Trap", comparado com aqueles obtidos por outros instrumentos e mantidos no banco de dados do "software".

O problema é essencialmente duplo. Por um lado, altas concentrações da amostra combinada com significantes tempos de aprisionamento (vários milissegundos), levam à ocorrência de reações íon/molécula, e portanto, mudam a identidade dos íons a serem analisados e também causam uma perda quantitativa de resposta. Em segundo lugar, o aumento da densidade de íons dentro do "Ion-Trap" pode acarretar efeitos de carga espacial, modificando substancialmente o campo elétrico no qual os íons estão sujeitos, causando portanto mudanças nas posições das fronteiras do diagrama de estabilidade, resultando em mudanças nas razões massa/carga associada aos íons [51]. O modo mais fácil de evitar estes dois efeitos é alterar o tempo de ionização de uma maneira controlada fazendo uso do método do controle de ganho automático (CGA). A função de varredura tem a missão de controlar os três processos que ocorrem na armadilha iônica: ionização, análise de massas e detecção. A função CGA se constitui de uma pré-varredura e quatro segmentos de varredura, onde se utiliza um gás padrão, com vistas à calibração dos quatro intervalos de massa do espectrômetro. Os quatro segmentos de varredura correspondem às quatro porções de intervalos de massa: 10 a 99 m/z, 100 a 249 m/z, 250 a 399 m/z e 400 a 650 m/z. O "software" da rotina de CGA seleciona automaticamente um tempo de ionização de 10 μ s a 25 ms para cada um dos segmentos de varredura da micro-varredura, dependendo da quantidade de amostra na armadilha iônica. Uma estimativa do número de íons formados na armadilha de íons é realizada com uma varredura curta que consiste de um período de ionização de 0,1 ms. Para picos de baixa intensidade é selecionado um tempo de ionização máximo de 25 milissegundos, que oferece mais de 25 vezes maior sensibilidade que na operação padrão da armadilha de íons sem CGA. Enquanto a

quantidade da amostra aumenta, o tempo de ionização decresce automaticamente de modo a prevenir a saturação de íons dentro da armadilha.

IV. 4. Detector de íons

Os detectores de íons mais utilizados nos espectrômetros de massas de armadilha iônica são denominados multiplicadores de elétrons. O multiplicador é posicionado abaixo do eletrodo-tampa inferior. Ele detecta os íons positivos quando são ejetados através de buracos na parte inferior do eletrodo-tampa. O multiplicador de elétrons no espectrômetro de massa "Ion Trap" é do tipo dinodo contínuo e constituído de óxido de chumbo (grafite/vidro), um resistor em forma de funil (o catodo) e um copo (o anodo) no fim do catodo (Figura 16).

Uma voltagem negativa (entre -800 e -3000 V) é aplicada no topo do catodo. A saída do catodo está num potencial nulo. Os íons positivos ejetados da cavidade da armadilha iônica são atraídos para o catodo, pela voltagem negativa aplicada ao mesmo. Estes íons colidem no catodo com suficiente velocidade para desalojar elétrons da superfície curva interna do catodo. Os elétrons ejetados são acelerados para o interior do multiplicador de elétrons, direcionados pelo crescente gradiente de potencial positivo. Como resultado da curvatura do multiplicador de elétrons, os elétrons ejetados não viajam muito longe antes que os mesmos atinjam novamente a superfície interna do multiplicador, dessa forma causando a emissão de mais elétrons. Portanto, uma cascata de elétrons é criada e acelerada em direção ao potencial nulo no fim do catodo. Os elétrons são coletados pelo anodo, e o sinal de corrente iônica resultante é passado a um eletrômetro na placa de controle analógico. O sinal da corrente iônica é proporcional ao número total de elétrons ejetados da armadilha iônica. Tipicamente, a voltagem aplicada ao multiplicador de elétrons é ajustada para dar um ganho de 10^5 , isto é, para cada íon que entra no multiplicador de elétrons, aproximadamente 10^5 elétrons são gerados.

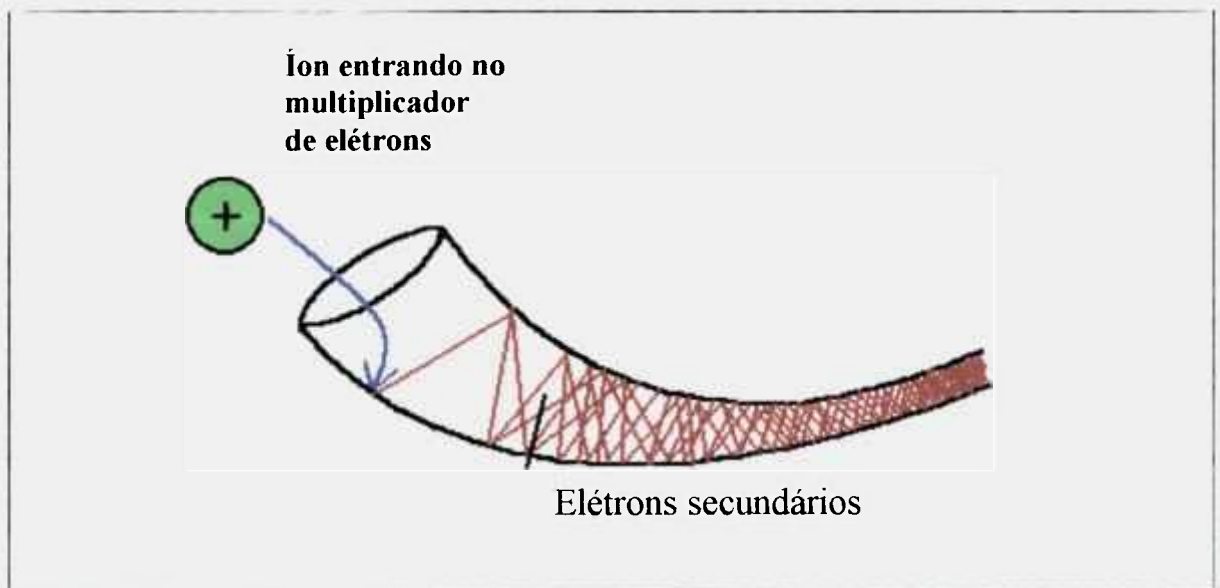


Fig 16. Detector multiplicador de elétrons do espectrômetro de massa "Ion Trap".

IV. 5. Armazenagem de íons selecionados (AIS)

Normalmente a varredura de massas é o resultado da aplicação de um único campo dipolar suplementar nos eletrodos-tampa (direção axial-z) do "Ion Trap", e de um aumento linear da voltagem de radio-freqüência. Na medida em que a voltagem aumenta, as freqüências seculares dos íons aumentam até que as mesmas se igualam à freqüência suplementar aplicada. Neste ponto, ocorre a ressonância, e o íon absorve energia do campo elétrico externo. A ejeção ressonante pode ser usada para ejetar múltiplos íons num campo fixo de radio freqüência. Isto é realizado pela aplicação de freqüências múltiplas nos eletrodos-tampa do "Ion Trap". Explicitamente, sabe-se que cada íon armazenado na armadilha iônica tem valores a_z e q_z associados. Estes íons têm trajetórias cuja freqüência de oscilação é aproximadamente [59],

$$w_{z,0} = \beta_z \frac{\Omega}{2} = \left(a_z + \frac{q_z^2}{2} \right)^{\frac{1}{2}} \frac{\Omega}{2} \quad (4.2)$$

Considerando o caso particular em que $U = 0$ (os espectrômetros de massas de armadilha iônica comerciais normalmente operam nesta condição) na equação (3.24), ou seja $a_z = 0$ na equação 4.2, temos:

$$w_{z,0} = \frac{q_z \Omega \sqrt{2}}{4} \quad (4.3)$$

Substituindo q_z (eq. 3.24) na equação 4.3 temos:

$$w_{z,0} = \frac{eV 2\sqrt{2}}{m(r_0^2 + 2z_0^2)} \Omega \quad (4.4)$$

A equação (4.4) nos mostra que a cada massa iônica temos associada uma frequência secular onde o índice zero corresponde às frequências de primeira ordem. Considerando este fato, podemos aplicar uma forma de onda suplementar que utilize as frequências características de cada massa na direção z . Este campo elétrico auxiliar aplicado nos eletrodos-tampa, atua nos íons que possuem a mesma frequência de oscilação de tal forma que ocorre transferência de potência deste para os íons, desencadeando o processo de ressonância. Em consequência, os íons adquirem suficiente energia cinética, da ordem de 10 a 30 eV e são ejetados [60]. O modo de "Armazenagem de Íons Seleccionados" - AIS (Selected Ion Storage-SIS) leva exatamente este fenômeno em conta, acumulando íons seletivamente na armadilha iônica e ejetando os íons ressonantes. Um método conveniente de aplicar múltiplas frequências é utilizar uma forma de onda multifrequência de banda larga. As formas de onda multifrequências usadas no AIS incluem aquelas frequências requeridas para ejeção dos íons indesejados do "Ion-Trap", sem afetar os íons a serem armazenados. A modulação da radio-frequência de armazenamento aumenta e diminui as frequências seculares dos íons no "Ion-Trap"; dessa forma, os íons indesejados podem ser movimentados dentro e fora da ressonância com as frequências da forma de onda suplementar, levando à ejeção dos íons indesejados e acumulando os íons de interesse (Figura 17).

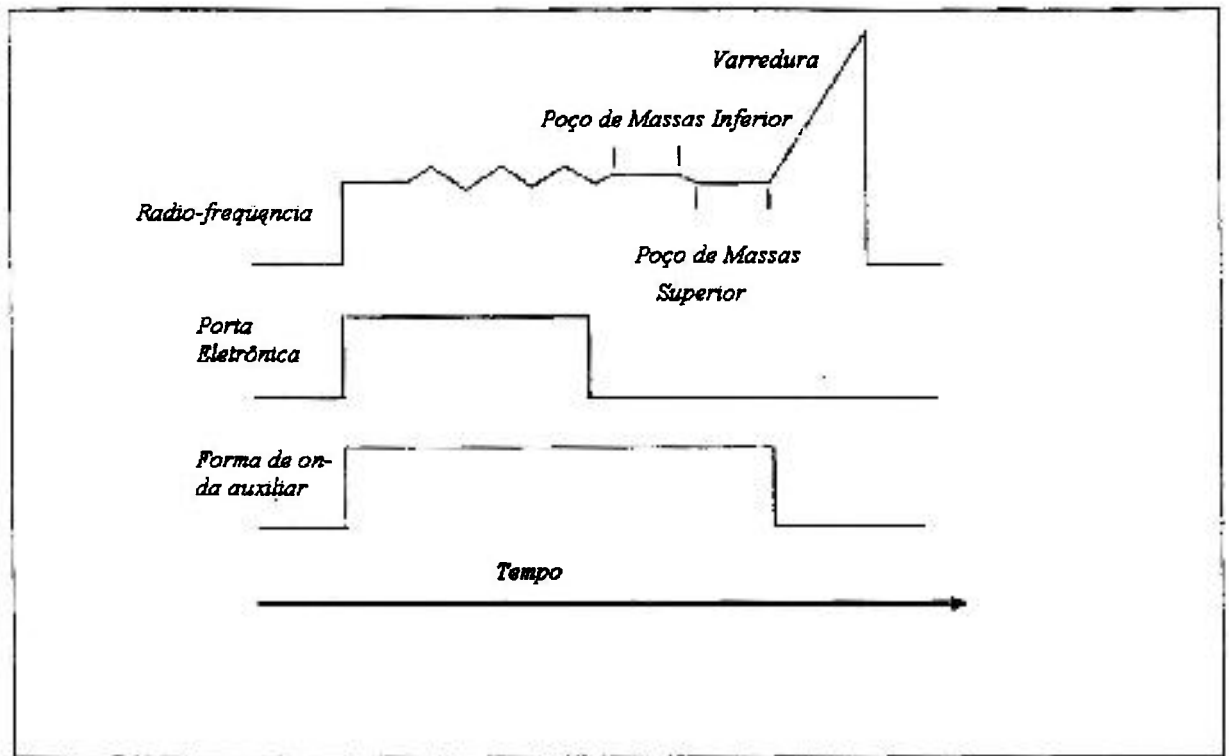


Figura 17. Diagrama temporal do modo AIS. A RF, porta eletrônica e forma de onda auxiliar são acionadas ao mesmo tempo. A amplitude da RF do campo aprisionador é modulada para variar as freqüências seculares.

V. METODOLOGIA

Neste capítulo é exposta a metodologia desenvolvida para este trabalho no que diz respeito à calibração, técnicas de detecção e aspectos práticos necessários à detecção e caracterização de pesticidas Piretróides via GC/MS; além disso abordamos a técnica de extração de pesticidas em leite utilizando-se coluna cromatográfica preenchida com sílica-gel.

V. 1. Verificações e calibração do espectrômetro de massas

Previamente ao procedimento de calibração, algumas verificações devem ser executadas de forma a garantir a integridade do mesmo. No painel de controle do cromatógrafo a gás, posiciona-se o valor da pressão de entrada de gás Hélio a 12 psi na coluna DB5 com 30m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura da fase estacionária (dimetil-siloxana, 5% fenila) de 0,2 μm . O fluxo médio no interior da coluna é posicionado a 1 ml/min. Verifica-se a existência de vazamentos no sistema GC/MS monitorando-se a quantidade de ar e água através do software de controle "Saturn-3" instalado no micro-computador. Através do mesmo "software" de controle, verifica-se se o sistema de vácuo está trabalhando numa pressão negativa adequada ao funcionamento do "Ion-Trap" ($<10^{-5}$ Torr).

A calibração em si é um procedimento automático no qual o software de controle "Saturn-3" executa algumas tarefas que levam à otimização da forma e intensidade dos picos cromatográficos. Este procedimento faz uso, em algumas etapas, do composto Perfluortributilamina (PFTBA), $\text{C}_{12}\text{F}_{27}\text{N}$, também denominado Fluorcarbono-43 (FC-43), utilizado como substância de calibração pelo espectrômetro de massas. As seguintes funções são realizadas no procedimento de calibração:

- a) Verifica-se se as concentrações de água e ar estão em níveis aceitáveis no interior da armadilha iônica.

- b) Verifica-se se sinal do circuito integrador está um pouco acima do zero quando o filamento está desligado. A média do sinal do ruído eletrônico é ajustada para que esta condição.
- c) Estabelece-se a voltagem do multiplicador de elétrons. A voltagem é ajustada de tal forma que haja um ganho de 10^5 elétrons por íon.
- d) Estabelece-se a corrente de emissão de filamento. O filamento de Rênio emite elétrons a partir de uma certa temperatura. O sistema de dados estabelece o melhor valor de corrente de filamento, que pode variar de 5 a 100 μA .
- e) Ajusta-se a pressão do gás de calibração. O filamento, o multiplicador de elétrons e a voltagem de radio-freqüência (RF) são acionados; a válvula solenóide da ampola que admite o gás de calibração é aberta; o intervalo de varredura é estabelecido de forma a exibir no micro-computador os picos que estão presentes no intervalo de massa/carga que vai de 45 a 165 u.m.a. O programa determina se a pressão do gás de calibração está baixa, alta ou adequada.
- f) Ajusta-se a função de Controle de Ganho Automático (CGA) (descrita no item V. 2).
- g) Realiza-se a calibração de massa. O programa automaticamente determina a relação entre a amplitude de voltagem de RF e os picos de massa do composto de calibração.

Cabe salientar que quaisquer parâmetros determinados pela calibração automática podem ser alterados manualmente, conforme a necessidade da análise em questão.

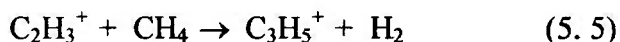
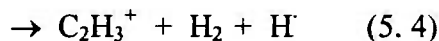
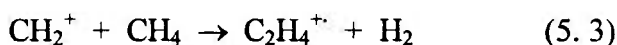
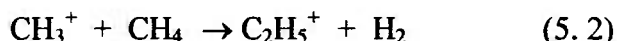
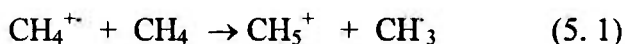
V. 2. O impacto de elétrons (IE) e a função de controle de ganho automático (CGA)

Como foi visto na secção IV. 1, as moléculas da amostra, no modo de operação IE, são introduzidas na armadilha iônica onde as mesmas interagem com elétrons energéticos provenientes do filamento de rênio aquecido, formando íons positivos. Neste modo de operação, a função CGA controla a ionização, a análise de massas e detecção na armadilha iônica (secção IV. 3). A armadilha iônica tem uma capacidade máxima de armazenamento além da qual a resolução de massas e a capacidade espectral se deterioram. A função de varredura CGA está baseada na relação linear entre o tempo de ionização e a quantidade de íons criada e subseqüentemente armazenada na armadilha iônica. O feixe de elétrons do filamento gera íons por colisão com as moléculas introduzidas na armadilha iônica; o software controla o tempo de ionização de tal forma que a quantidade de íons

pode ser mantida num nível ótimo. Além disso, o número de íons formados na armadilha é também função da corrente de emissão do filamento; tanto a ionização como a intensidade do feixe de elétrons controlam diretamente o número de íons formados. O melhor desempenho da armadilha iônica, ou seja, o que produz a melhor qualidade espectral com boa resolução, ocorre quando uma quantidade ótima de cargas está presente no interior da armadilha iônica.

V. 3. Ionização química com metano

Nesta técnica o gás metano é inicialmente ionizado por IE. Subseqüentemente, as moléculas da amostras são ionizadas pela interação destas com os íons originários do gás metano. Neste caso, a maior parte dos íons primários formados por impacto de elétrons é constituída dos íons CH_4^+ , CH_3^+ e CH_2^+ . Estes reagem conforme indicado abaixo para formar a maioria dos íons observados segundo as seguintes reações:



A ionização química só ocorrerá se os íons de Metano possuírem proto-afinidades menores que a proto-afinidade da molécula de interesse (5.6), ou seja:

$$PA_{\text{metano}} < PA_{\text{molécula}} \quad (5.6)$$

Os principais íons formados a uma pressão de 1 torr (reações 5.1 a 5.5) e suas respectivas abundâncias são: CH_5^+ (48%), C_2H_5^+ (41%) e C_3H_5^+ (6%), que possuem proto-afinidades iguais a 131,6 kcal/mol, 162,6 kcal/mol e 175,8 kcal/mol respectivamente [57, 58]. Se a condição 5.6 for satisfeita, ocorrerá interação e protonização entre os íons de Metano e a molécula de interesse em quase todas as colisões. Na medida em que a reação de transferência de prótons torna-se termo-neutra, a eficiência da reação cai e torna-se muito baixa para reações endotérmicas. A possível molécula protonada formada (M-H^+)

em muitos casos, pode possuir excessiva energia interna e fragmentar-se em íons menores [58]. Nestas condições, quanto menor a diferença de proto-afinidade entre a molécula de interesse e o íon reagente, melhor será observado o íon $M-H^+$ (Tabela 5).

Tabela 5. Proto-afinidades dos principais íons dos gases reagentes utilizados em Espectrometria de Massa com ionização química positiva.

Gás Reagente	Íon Reagente	Proto-afinidade (kcal/mol)
H ₂	H ₃ ⁺	101.2
N ₂ /H ₂	N ₂ H ⁺	118.2
CO ₂ /H ₂	CO ₂ H ⁺	130.8
N ₂ O/H ₂	N ₂ OH ⁺ ^a	138.8
CO/H ₂	HCO ⁺	142.4
CH ₄	CH ₅ ⁺	131.6
	C ₂ H ₅ ⁺	162.6
H ₂ O	H ⁺ (H ₂ O) _n	166.5
CH ₃ OH	H ⁺ (CH ₃ OH) _n	181.9
C ₃ H ₈	C ₃ H ₇ ⁺	179.5
i-C ₄ H ₁₀	C ₄ H ₉ ⁺	195.9
NH ₃	H ⁺ (NH ₃) _n	204.0

a- íon NO⁺ também é observado

Uma condição necessária para que espectrômetro de massas opere no modo de ionização química (IQ) é de o que o mesmo esteja calibrado no modo IE. Tipicamente, o modo IQ deve ser preparado de acordo com as seguintes etapas:

- Estabelece-se a corrente de emissão de filamento, tipicamente 10 μ A. A temperatura da cavidade iônica deve estar situada entre 150 e 175 °C;
- Seleciona-se o gás metano como gás reagente;
- Ajusta-se a pressão do gás. Isto é realizado comparando-se o espectro do Metano, fornecido no manual do fabricante, com o espectro obtido experimentalmente quando se modifica a pressão do Metano através de uma válvula tipo agulha.

V. 4. O modo AIS (Armazenagem de Íons Seleccionados)

Como foi apresentado na secção IV. 5, o modo AIS utiliza frequências seculares características dos íons no campo quadrupolar, impondo a estes uma forma de onda de multifrequência, que exclui íons indesejados e armazena seletivamente os íons de interesse. Isto é realizado especificando-se o intervalo de massas dos íons a serem armazenados. Como cada massa tem uma única frequência secular a uma dada RF (equação 4.4), é possível se construir uma forma de onda que não inclua frequências próximas às frequências seculares dos íons a serem armazenados. A forma de onda resultante consistirá de uma distribuição de frequências discretas com frequências ausentes, os chamados nós, correspondentes às frequências dos íons armazenados.

V. 5. O modo MIS (Monitoração de Íons Seleccionados)

Em oposição ao modo AIS, o modo de Monitoração de Íons Seleccionados não diz respeito ao isolamento físico de íons no interior da armadilha iônica mas sim se constitui num procedimento “off-line” realizado com a ajuda do “software” do sistema Saturn-3 no qual escolhem-se íons do espectro de massa total que são utilizados na “reconstrução” do cromatograma levando-se em conta apenas suas respectivas contribuições para a intensidade total e dessa forma eliminando as contribuições advindas do substrato. A rotina do programa Saturn-3 possibilita a seleção de um único íon, soma de até 3 íons ou intervalo iônico na reconstrução do Cromatograma e desta forma, analitos não identificáveis no Cromatograma total podem sê-los, na medida que os mesmos se destacarão do substrato total e serão passíveis de caracterização.

V. 6. Os parâmetros do cromatografo a gás (CG)

O cromatógrafo a gás (Figura 18) é composto das seguintes partes físicas:

- 1) Cilindro de gás de arraste.
- 2) Controlador de fluxo do gás.
- 3) Injetor da amostra.
- 4) Termostatos da coluna.
- 5) Coluna cromatográfica capilar.
- 6) Detector.
- 7) Registro digital.

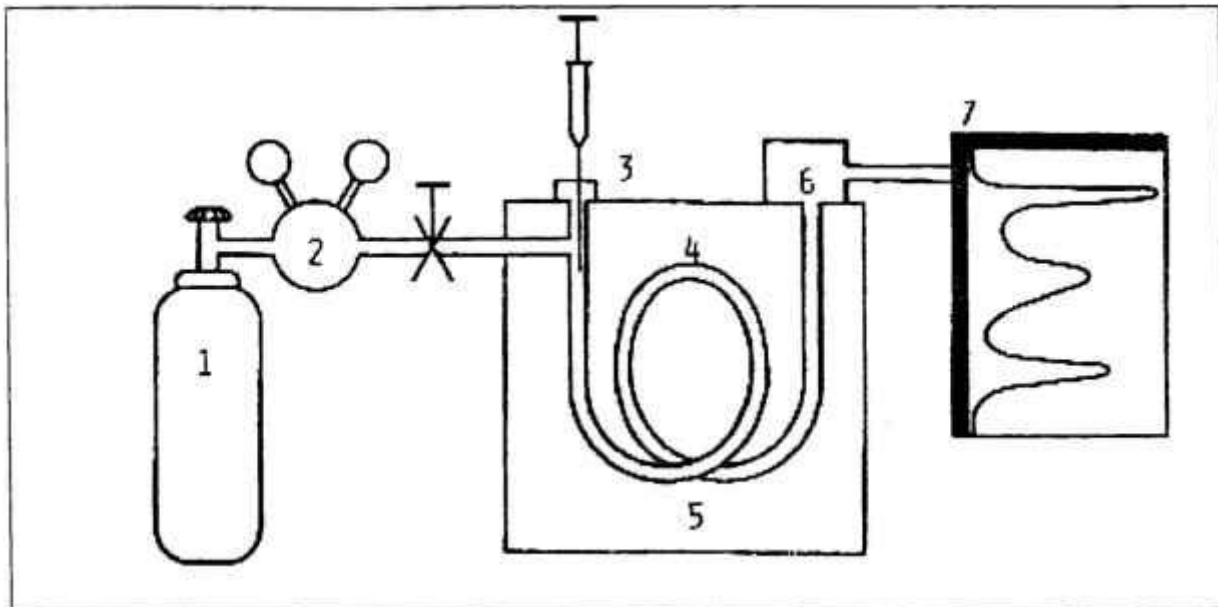


Figura 18. Esquema do Cromatógrafo a Gás mostrando seus principais componentes.

A inserção da amostra líquida ou gasosa é realizada manualmente através de uma seringa graduada em micro-litros. Em geral, apenas 1 μL da amostra é necessário para a aquisição de dados. A amostra, imediatamente após a inserção, é vaporizada no injetor, que possui um controlador de temperatura, e é arrastada através da coluna pelo gás de arraste que tem a função de levar as substâncias presentes na amostra para fora da coluna, em direção ao detector, quando elas não estiverem interagindo com a fase estacionária. Vários tipos de detectores podem ser utilizados no sistema de um cromatógrafo a gás. Entre eles podemos citar o detector por condutividade térmica, o detector por ionização em chama, o detector por captura de elétrons, o detector termoiônico e o espectrômetro de massas, entre outros.

A coluna capilar utilizada neste trabalho, DB5, tem como fase estacionária a dimetil-siloxana (5% fenil), que interage com os componentes da amostra na medida em que sua polaridade concorda com as polaridades dos componentes da mesma. Quando a concordância é boa, a ordem da eluição é determinada pelos pontos de ebulição dos componentes. Tipicamente, os tempos de retenção e as intensidades dos picos cromatográficos são controladas pela programação de temperatura da coluna. A temperatura deverá ser suficientemente alta para que a análise se efetue num prazo razoável e suficientemente baixa para efetuar a separação desejada. Segundo uma aproximação feita por Giddings [62], o tempo de retenção se duplica a cada 30 $^{\circ}\text{C}$ que se diminui a temperatura da coluna. Na maioria das colunas, quanto menor a temperatura melhor a separação dos picos cromatográficos. No entanto, quando se consideram os

pontos de ebulição dos compostos Piretróides (Tabela 1), verifica-se ser inconveniente trabalhar, na maioria dos casos, com temperaturas abaixo de 170 °C, visto que a maioria dos pontos de ebulição destes pesticidas está acima deste valor.

Classificam-se as análises cromatográficas em dois tipos: Análises isotérmicas e análises de temperatura programada. Nas análises isotérmicas se utiliza uma única temperatura de coluna. A operação isotérmica limita a análise a amostras com pontos de ebulição pouco amplos. A temperaturas constantes, os picos iniciais, que representam os componentes com baixo ponto de ebulição, saem da coluna com tal rapidez que vários picos se superpõe e os compostos com maior ponto de ebulição saem com muito atraso e sofrem um alongamento na forma dos picos (Figura 19). Em alguns casos os componentes de alto ponto de ebulição não são eluídos e podem aparecer numa análise

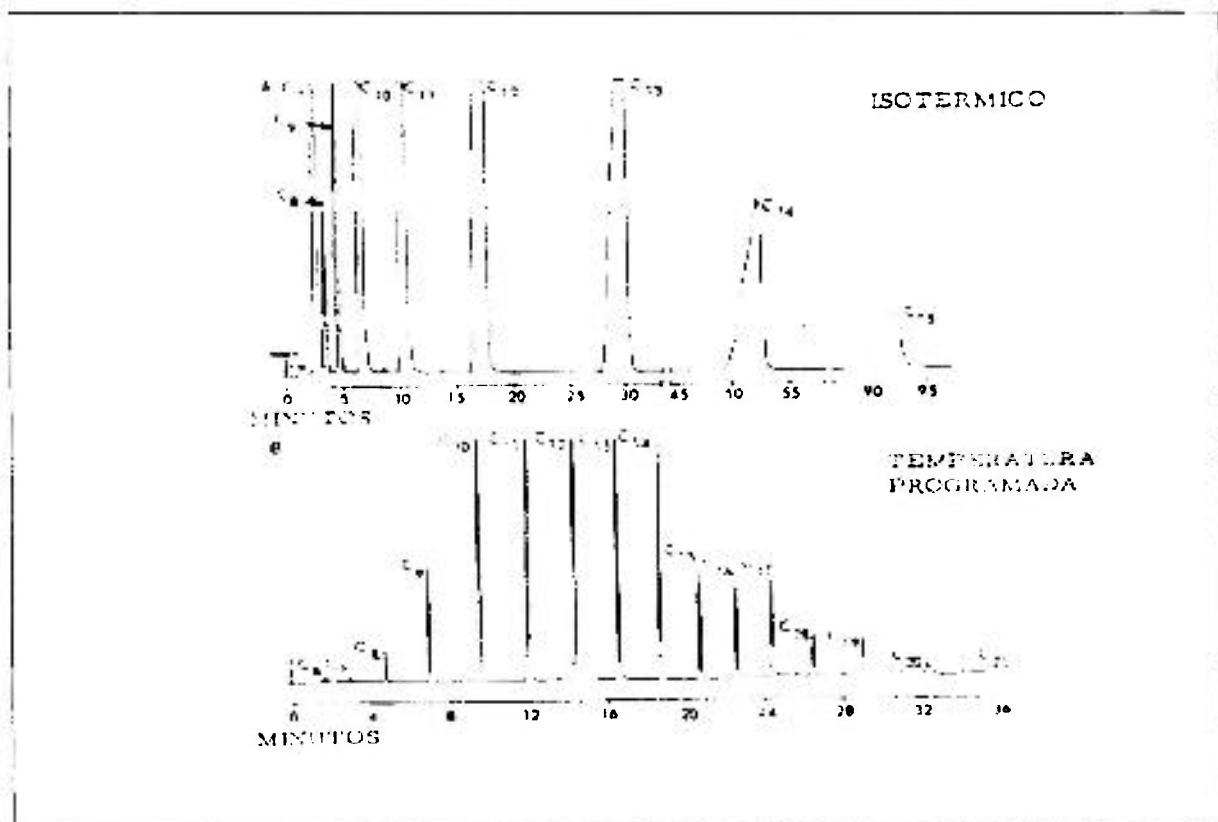


Figura. 19. Cromatograma no modo isotérmico e com programação de temperatura de coluna.

posterior como ruídos na linha de base ou como inexplicáveis picos fantasmas.

Com a programação de temperatura, utiliza-se uma temperatura inicial baixa e assim os picos iniciais saem bem resolvidos. Na medida em que se aumenta a temperatura, cada componente de maior ponto de ebulição é eluído em função do aumento de

temperatura. Os compostos com ponto de ebulição menor saem mais rapidamente e com picos melhor definidos. Os componentes traços aparecem como picos bem definidos e podem facilmente serem distinguidos da linha de base e o tempo total de análise é mais curto. Em resumo, a temperatura programada permite a seleção apropriada de uma temperatura que dará picos bem resolvidos, de forma bem definida e num tempo total de análise mais curto do que na operação isotérmica.

V. 7. Características do espectrômetro de massas como detector

O espectrômetro de massa pode ser visualizado como um outro detector para cromatografia a gás, tais como os detectores de condutividade térmica, de ionização por chama, por captura de elétrons, entre outros. Desta forma podemos listar algumas características típicas atribuídas a este aparato.

V. 7-1. Limite mínimo de detecção (L.M.D) e quantificação (L.M.Q.)

Os limites mínimos de detecção e quantificação podem ser definidos como se segue:

$$\frac{S}{N} = 3 \quad (\text{L.M.D.}) \quad (5.7)$$

$$\frac{S}{N} = 10 \quad (\text{L.M.Q.}) \quad (5.8)$$

Nas equações 5.7 e 5.8, o sinal (S) é definido como a resposta medida como diferença entre a amostra e a linha de base (médias), e o ruído (N) é definido como o desvio padrão das flutuações da resposta do instrumento com relação à linha de base. O L.M.D. (limite mínimo de detecção) denota a menor concentração que pode ser detectada com uma determinada técnica e o L.M.Q. (limite mínimo de quantificação) se refere a menor concentração que pode ser quantificada.

V. 7-2. Sensibilidade

A sensibilidade denota a quantidade de sinal gerada para uma determinada concentração da amostra. O espectrômetro sensível gerará um sinal elétrico substancial e proporcional a uma determinada concentração da amostra.

V. 7-3. Ruído

O ruído se refere à resposta do espectrômetro aos sinais aleatórios determinados pelas propriedades do detector em si e dos circuitos elétricos adjacentes. O ruído determina como detectar uma amostra pequena. Em geral se define como quantidade mínima detectável (Q.M.D.) ou limite mínimo de detecção (L.M.D.) àquela amostra suficientemente grande para gerar um sinal três vezes maior que seu nível de ruído. Observe que tanto a sensibilidade, o ruído e a Q.M.D. do sistema GC/MS dependem grandemente das condições cromatográficas e do modo de detecção que venha a ser utilizada no espectrômetro. Relativamente às condições cromatográficas (vide item V. 6), altos pontos de ebulição combinados com pesos moleculares altos, necessitam de altas temperaturas de coluna, gerando linhas de base altas e picos alargados. Um dos principais fatores que geram linhas de base altas é o chamado "sangramento de coluna" no qual componentes da fase estacionária da coluna são arrastados pela fase móvel. Quanto maior a temperatura da fase estacionária maior a quantidade de componentes que se desprendem de sua superfície, acarretando aumento na linha de base. Depreende-se deste fato, que a quantidade mínima detectável dependerá fortemente do ponto de ebulição e do peso molecular do composto a ser analisado visto que altos pontos de ebulição e grande peso molecular acarretam tempos de retenção mais longos. Por outro lado, a utilização do modo AIS diminui de pelo menos uma ordem de grandeza a Q.M.D., devido à eliminação de íons da matriz interferente, acarretando um aumento substancial das relações sinal/ruído dos picos cromatográficos. Em geral pode-se afirmar que, para compostos orgânicos, quanto maior o peso molecular e o ponto de ebulição maior será a quantidade mínima detectável. Observe que quanto maior o tempo de retenção maior é o efeito acumulativo do "sangramento de coluna" levando a uma degradação na Q.M.D. e a alargamento dos picos para compostos que eluem mais lentamente. Por exemplo, o composto hexaclorodibenzeno (HCB) possui uma Q.M.D. e um limite de detecção da ordem de partes por trilhão (ppt). No entanto, o Piretróide Cipermetrina possui L.M.D. da ordem de 33 ppb (partes por bilhão) nas mesmas condições de concentração da amostra (ver capítulo V), ambos determinados no modo AIS com ionização por impacto de elétrons (IE). Cabe salientar que, além dos fatores acima citados, a resolução dos picos cromatográficos e os tempos de retenção dependem fortemente da estrutura química do analito e da fase

estacionária da coluna. Fatores como a polaridade da coluna, do solvente e da amostra afetam diretamente a análise cromatográfica.

V. 7-4. Resposta universal

O espectrômetro de massas de armadilha iônica, utilizado neste trabalho, responde a todos os componentes da amostra dentro do intervalo de massa estipulado de 40 a 650 u.m.a.

V. 7-5. Resposta linear

Cabe ao espectrometrista determinar qual a faixa de resposta linear do GC/MS relativamente às concentrações a serem determinadas; a linearidade das intensidades iônicas (alturas ou áreas) *versus* concentrações é essencial no sentido de estabelecer uma curva de calibração externa ou interna, necessárias à quantificação dos compostos presentes na amostra.

V. 8. Extração de Piretróides em leite

O estímulo inicial para a realização dos experimentos de extração de resíduos Piretróides em leite foi dado pela constatação da presença destes resíduos em leite de vaca [26, 27]. Estes animais, que foram submetidos a tratamento com Piretróides com o intuito de combater moscas-de-chifre e outros parasitas, apresentaram um conteúdo de Cipermetrina em leite que variou de 360 ppb, no primeiro dia após a aplicação, a 60 ppm após 28 dias. O método de extração utilizado nesse trabalho foi o seguinte: A amostra de leite (10 g) foi acidificada com 1.0 N de HCl com pH 4 e adicionada a 50 ml de acetonitrila grau HPLC, agitada por 30 minutos e então filtrada num funil de vidro com papel de filtro. O procedimento foi repetido com 25 ml de acetnitrila por 15 minutos. O filtrado foi transferido para um funil de separação; 15 ml de n-hexano grau HPLC foi adicionado e a mistura foi então homogeneizada. O procedimento foi repetido duas vezes e a fase em n-hexano foi descartada. A fase acetonitrila foi levada à evaporação [26, 27].

Em função do excesso de etapas do método acima descrito optou-se pelo método desenvolvido por Steinwandter [63] e utilizado, com modificações para Piretróides, pelo instituto Adolfo Lutz, São Paulo, na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais a partir de

1991 devido a sua simplicidade no que tange ao número de etapas e sobretudo porque a extração e a purificação são realizadas simultaneamente prevenindo-se contaminações no processo. Um estudo comparativo foi realizado por esse instituto [64], no qual comparou-se o método da Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C), que consiste em extração da gordura com partição em três solventes e cromatografia de adsorção com Florisil (método este utilizado desde 1969), com o método Steinwedter [64]. Constatou-se que ambos apresentavam recuperações satisfatórias. No entanto, optou-se pelo método Steinwandter em função do menor tempo gasto, menor quantidade de solventes utilizada e, como consequência, menor custo da análise [63].

O método descrito a seguir é conveniente para todas as amostras que são soluções aquosas, isto é, leite ou amostras que podem ser homogeneizadas com água, tais como: leite em pó, cacau, ovos, etc. O método em questão faz uso da extração e purificação por coluna cromatográfica dos pesticidas Piretróides extraídos da matriz orgânica (Figura 20).

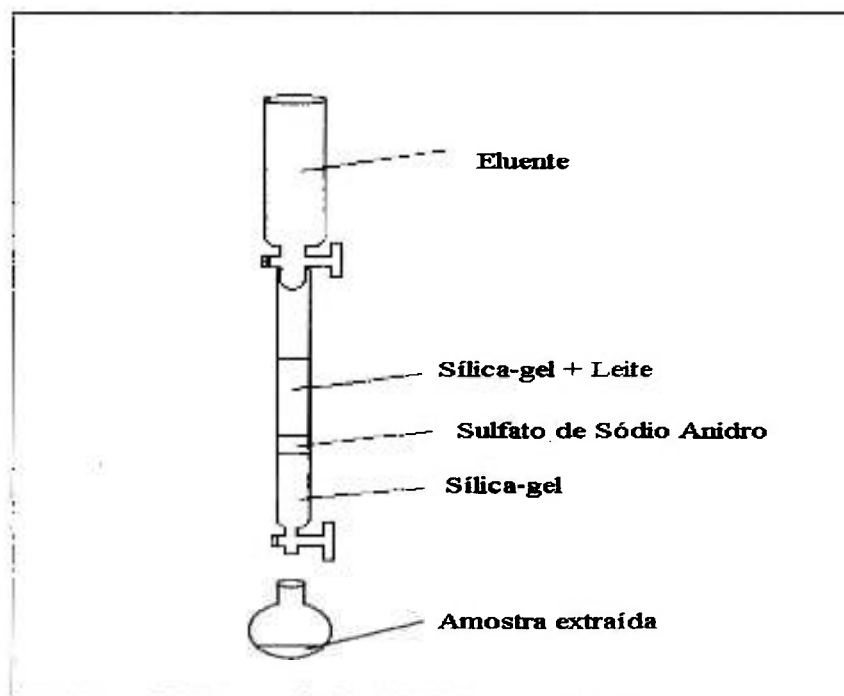


Figura 20. Esquema do método de extração de Piretróides em leite; utiliza-se uma coluna cromatográfica preenchida com sílica-gel.

O leite e produtos lácteos aquosos são homogeneizados num almofariz com sílica gel. Estas amostras, que podem conter até 40% em peso de água, são colocadas no interior de uma coluna previamente preenchida com sílica-gel (70 a 230 mesh) ativada (10% H₂O destilada), necessária à purificação. A extração e purificação dos Piretróides

ocorrem simultaneamente com uma mistura de diclorometano/n-hexano 50+50 (V/V). Os pesticidas se movem com o solvente da parte superior da sílica-gel para a parte inferior da coluna onde são purificados. A sílica-gel deve ser previamente aquecida a 450 °C por 3 horas e, após o resfriamento, estocada num frasco selado. A coleta do eluído é feita num balão de vidro que pode ser prontamente adaptado a um rotovapor, evitando perdas e contaminações devidas à troca de vasos. A coleta do eluído deve ser encerrada quando o gotejamento cair a 1 gota a cada três segundos. Subseqüentemente, o solvente é evaporado no roto-vapor até que se reduza a uma quantidade de 5 a 10 mL. A temperatura de evaporação, na medida em que não se utiliza uma bomba de vácuo, deve ser de 71 °C. Esta temperatura garantirá que todo o diclorometano seja evaporado (PE = 40,10 °C) e ocorra a concentração da amostra apenas em n-hexano (PE = 68,74 °C). Em qualquer caso a amostra coletada deve ser completada com n-hexano até 10 mL, para fins de quantificação.

Apenas 1 µL de amostra é necessário para a determinação dos piretróides no GC/MS (Figura 21). Após a evaporação e lavagem cuidadosas, a mostra pode ser transferida para um balão volumétrico de 10 mL. Estudos mostram que

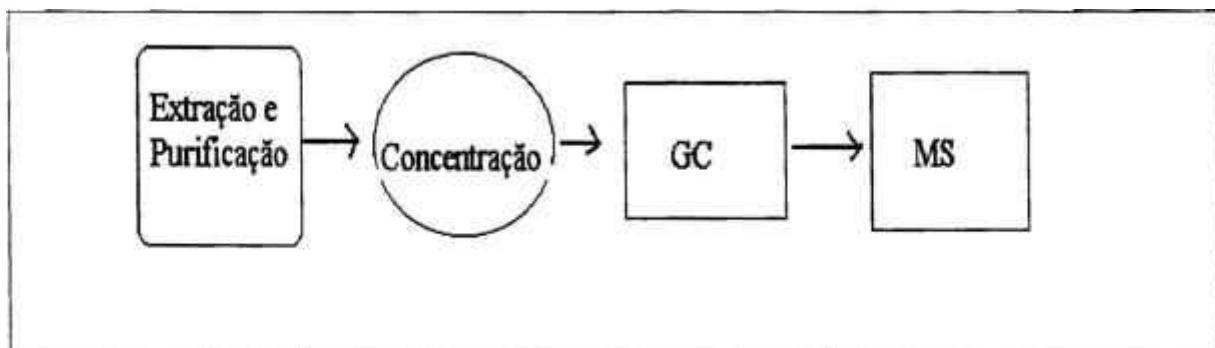


Figura 21. Etapas de extração e determinação de piretróides em leite que consistem na extração, purificação, separação no cromatógrafo gasoso e análise no espectrômetro de massa.

os pesticidas saem nos primeiros 10 mL do eluído quando se utiliza petróleo leve/diclorometano na proporção 4:1 como eluente [63]. Esta concentração de pesticidas na parte frontal do solvente ocorre somente se sílica-gel estiver desativada. A sílica-gel com conteúdo aquoso menor que 40% em peso tem propriedades que fazem com que rápidas transições cinéticas sejam possíveis. Extrações incompletas ocorrerão se o conteúdo de água na sílica-gel for muito alto ou muito baixo.

V. 9. Escolha do solvente

A escolha adequada do solvente ou mistura de solventes é essencial na eficiência da extração, sendo a polaridade do mesmo um fator primordial nesta escolha. Considerando-se este critério de seleção, a utilização de diferentes solventes pode ser baseada na classificação dada por Snyder [65, 66], que se refere a dados de solubilidade de solventes em 3 compostos com diferentes características: Etanol (bom receptor de prótons), Dioxano (bom doador de prótons) e Nitrometano (boa interação com momentos de dipolo). O índice de polaridade (P') é definido a partir de:

$$P' = \log(K_g'')_{\text{etanol}} + \log(K_g'')_{\text{dioxano}} + \log(K_g'')_{\text{nitrometano}} \quad (5.9)$$

onde K_g'' se refere à constante de solubilidade do soluto corrigida para os pesos moleculares do soluto e do solvente. Em algumas aplicações é útil distinguir-se a força do solvente de sua seletividade. A força do solvente depende de sua polaridade ou seja, a habilidade de preferencialmente dissolver compostos mais polares tais como nitrilas e álcoois. A seletividade do solvente refere-se à habilidade de um dado solvente de dissolver seletivamente um composto em oposição a outro, onde as polaridades dos dois compostos não são obviamente diferentes. Dessa forma um dos dois solventes deverá preferencialmente dissolver nitrilas, e o outro, álcoois. Na procura pela polaridade adequada de uma determinada mistura de solventes para a extração de Piretróides, o índice de Polaridade pode ser calculado pela relação:

$$P' = \phi_a P_a + \phi_b P_b \quad (5.10)$$

onde ϕ_a e ϕ_b são as frações dos volumes dos solventes A e B na mistura e os valores P_a e P_b são os índices de polaridade para os solventes puros A e B respectivamente. Baseando-se nos valores fornecidos por Snyder, a mistura de diclorometano e n-hexano (1:1) utilizada neste trabalho, pode ser calculada da seguinte forma:

$$P' = \phi_{\text{dicloromet}} \cdot P_{\text{dicloromet}} + \phi_{\text{n-hexano}} \cdot P_{\text{n-hexano}} \quad (5.11)$$

$$P' = (0,5)(3,1) + (0,5)(0,1) = 1,6 \quad (5.12)$$

O estudo da otimização de P' foi realizado misturando-se vários proporções dos solventes, por exemplo (1:1, 2:1, 1:2, 1:4 de diclorometano e n-hexano) e verificando-se a eficiência na extração do pesticida. Uma vez estabelecido o valor ótimo de P' , o efeito da solubilidade do solvente pode ser explorado utilizando-se solventes com valores similares de P' , mas com seletividades diferentes. Por exemplo, poder-se-ia utilizar uma mistura de Hexano/Tolueno 60/40 (V/V) que proporciona um valor de 1,56 para o índice de polaridade. A importância das interações de dipolos e pontes de hidrogênio que, por sua vez é determinada pela presença de grupos funcionais dentro da molécula do solvente, está diretamente ligada à sua seletividade e portanto constitui-se num fator a ser considerado quando da escolha dos solventes adequados ao procedimento de extração.

A utilização do coeficiente de Snyder leva a etapas experimentais cansativas e dispendiosas pois em geral, não há dados disponíveis para o Índice de Polaridade de pesticidas. Uma medida mais atual e disponível quanto à solubilização de um determinado analito em uma determinada mistura de solventes é o chamado logaritmo do Coeficiente de Partição n-octanol/água, ou mais propriamente $\log P$, sendo P é definido como:

$$P = \frac{c_o}{c_a} \quad (5.13)$$

onde c_o é concentração do soluto na fase n-octanol e c_a é a concentração do soluto na fase aquosa. Analogamente ao coeficiente de Snyder, escolhe-se $\log P$ o mais próximo possível do valor de $\log P$ para o analito de interesse, desta forma maximizando a possibilidade de solubilização e separação do solvente utilizado relativamente ao analito de interesse. Para o Piretróide Cipermetrina, $\log P$ tem um valor calculado de 2,44. Para a mistura de solventes utilizada, o valor médio de $\log P$ é dado por:

$$\frac{\log P_{n\text{-hexano}} + \log P_{\text{dicloromet.}}}{2} = \frac{3,90 + 1,25}{2} = 2,57 \quad (5.14)$$

Este valor é bastante próximo do valor de $\log P$ para a Cipermetrina, o que indica que a mistura de solventes 1:1 de n-hexano/diclorometano é satisfatória no que diz respeito à capacidade de extração do analito de interesse.

VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo dos espectros de massas, no que se refere aos seus padrões de fragmentação, tem grande relevância em termos de informações estruturais advindas dos mesmos. Muitos dos compostos orgânicos possuem potenciais de ionização que variam de 7 a 15 eV [57] e, conseqüentemente, quando estes são atingidos por elétrons de 70 eV (modo IE), poder-se-ia esperar que estes compostos fossem facilmente ionizados e realmente o são. No entanto, quando observamos seus espectros de massas, freqüentemente o íon molecular está presente de forma bastante reduzida ou não pode ser observado de todo. Isto ocorre porque as energias de ligação dos átomos no interior da molécula são menores que os próprios potenciais de ionização. A energia fornecida por elétrons de 70 eV, é transferida às moléculas fragmentando-as em vários pedaços. No caso de pesticidas Piretróides, este fato é particularmente verdadeiro e mesmo fazendo-se uso do método de ionização química, que envolve energias da ordem de 1 a 7 eV, o pico molecular obtido, em muitos casos, não passa de um traço. Correlacionando-se os espectros de fragmentação e os principais caminhos pelos quais ocorre clivagem molecular é possível avaliar-se qualitativamente quais ligações covalentes possuem menor energia de ligação. Portanto, se ocorrer clivagem de uma determinada ligação química em condições de ionização química no espectrômetro de massas, podemos afirmar que tal ligação possui energia menor que 7 eV, que corresponde à máxima energia transferível às moléculas da amostra por este processo. Com estas informações é possível prever-se quais sítios sofrerão clivagem quando a molécula de interesse sofrer a ação metabólica nos organismos de seres vivos ou quando a mesma for degradada no solo e em alimentos.

VI. 1. Espectros de massa da Permetrina

O cromatograma total obtido através do GC/MS por ionização por impacto de elétrons para a Permetrina com 15 mg/L, é apresentado na Figura 22. O composto foi identificado via “software” do sistema, onde o espectro de massa obtido foi comparado com espectros fornecidos por um banco de dados NIST-1992.

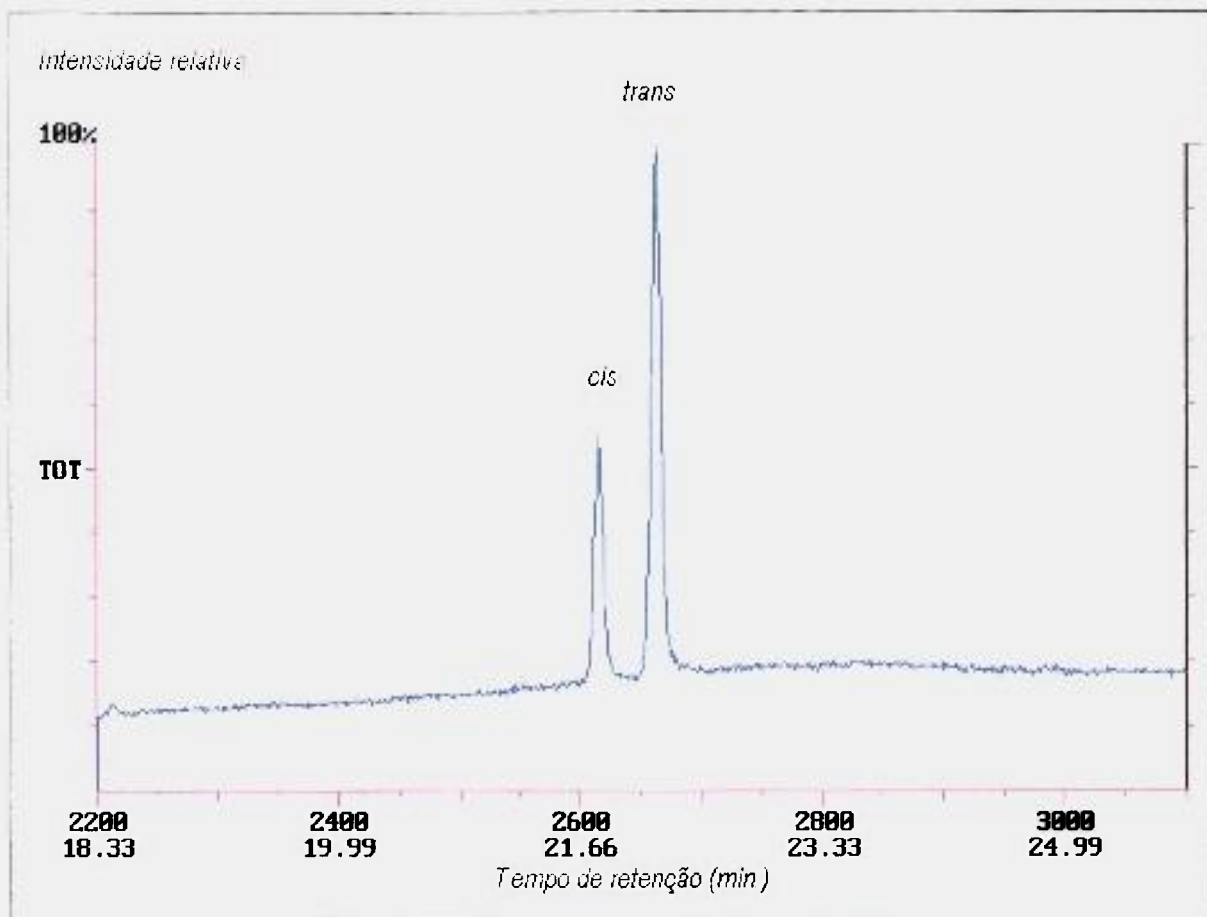


Figura 22. Cromatograma do Piretróide Permetrina obtido no modo de impacto por elétrons (IE). Observe-se a existência de isômeros denominados respectivamente *cis* e *trans*.

A programação de coluna realizou-se da seguinte forma: Inicialmente variou-se a temperatura da coluna de 50 a 240 °C por 8,01 minutos. A mesma foi mantida a 240 °C por 9,00 minutos; em seguida a temperatura foi elevada de 240 °C a 260 °C em 3,22 minutos e mantida a 260 °C por 8,00 minutos. As temperaturas do Injetor, Linha de Transferência e Detector foram respectivamente 260, 270 e 170 °C. Os dois picos cromatográficos observados correspondem aos isômeros do tipo *cis* e *trans* que eluem pela coluna cromatográfica DB5 com tempos de retenção distintos, respectivamente 21,79 e 22,18 minutos. Com respeito à intensidade relativa dos dois isômeros calculada em área, observamos uma proporção de aproximadamente 1:2,5. Os picos cromatográficos observados na Figura 22 correspondem à varredura dos íons formados no interior da armadilha iônica onde se observam linhas características correlacionadas com os fragmentos iônicos do composto molecular em questão (Figura 23).

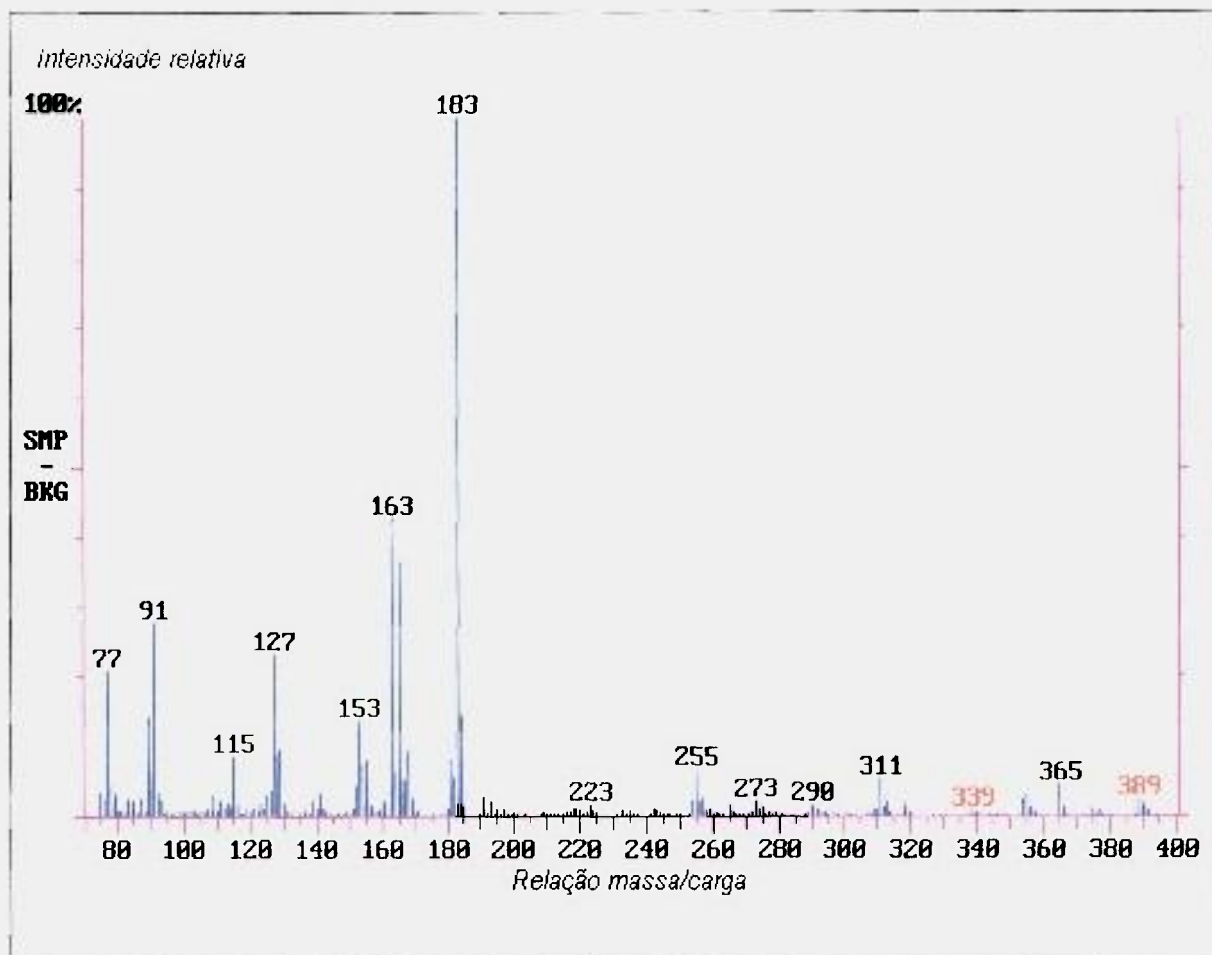


Figura 23. Espectro de fragmentação do Piretróide Permetrina no modo IE.

A fragmentação preferencial ocorre na ligação éster, processo no qual ocorre a formação dos íons com m/z 183 e 207. O íon com m/z 207, por sua vez, fragmenta-se de duas maneiras: 1) Dá origem aos íons com m/z 163 e 44 (o íon com m/z 44, não é observado no espectro pois o limite inferior da varredura de massa utilizado está acima deste valor). 2) Pode dar origem ao íon com m/z 127 através do processo de fragmentação e recombinação no qual ocorre a perda de Cl_2C e recombinação do carbono com três hidrogênios formando um substituinte CH_3 . O íon com m/z 183 também se fragmenta nos íons com m/z 106 e 77. O íon com m/z 106 perde seu átomo de oxigênio originando o íon com m/z 91. A presença do íon com m/z 165 se deve à existência da contribuição do isótopo ^{37}Cl . Todos estes processos são representados na Figura 24.

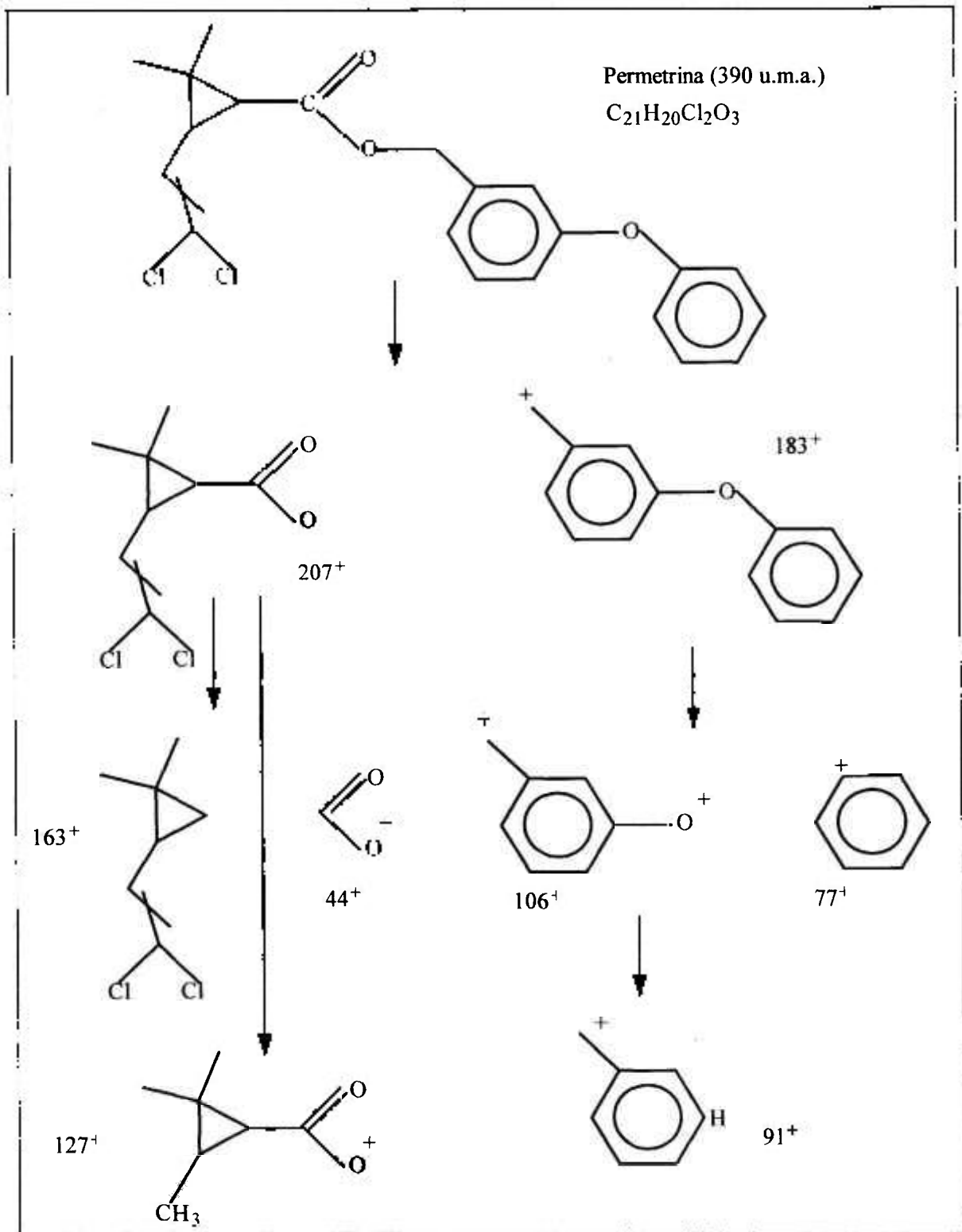


Figura 24. Sugestão para a origem do espectro de fragmentação da Permetrina no modo IE.

Num segundo processo, obtivemos os picos cromatográficos no modo de ionização química com gás Metano (Figura 25) no qual ocorre o processo a que denominamos de "ionização suave" pois as energias envolvidas no processo de ionização e transferência protônica são da ordem de 1 a 7 eV.

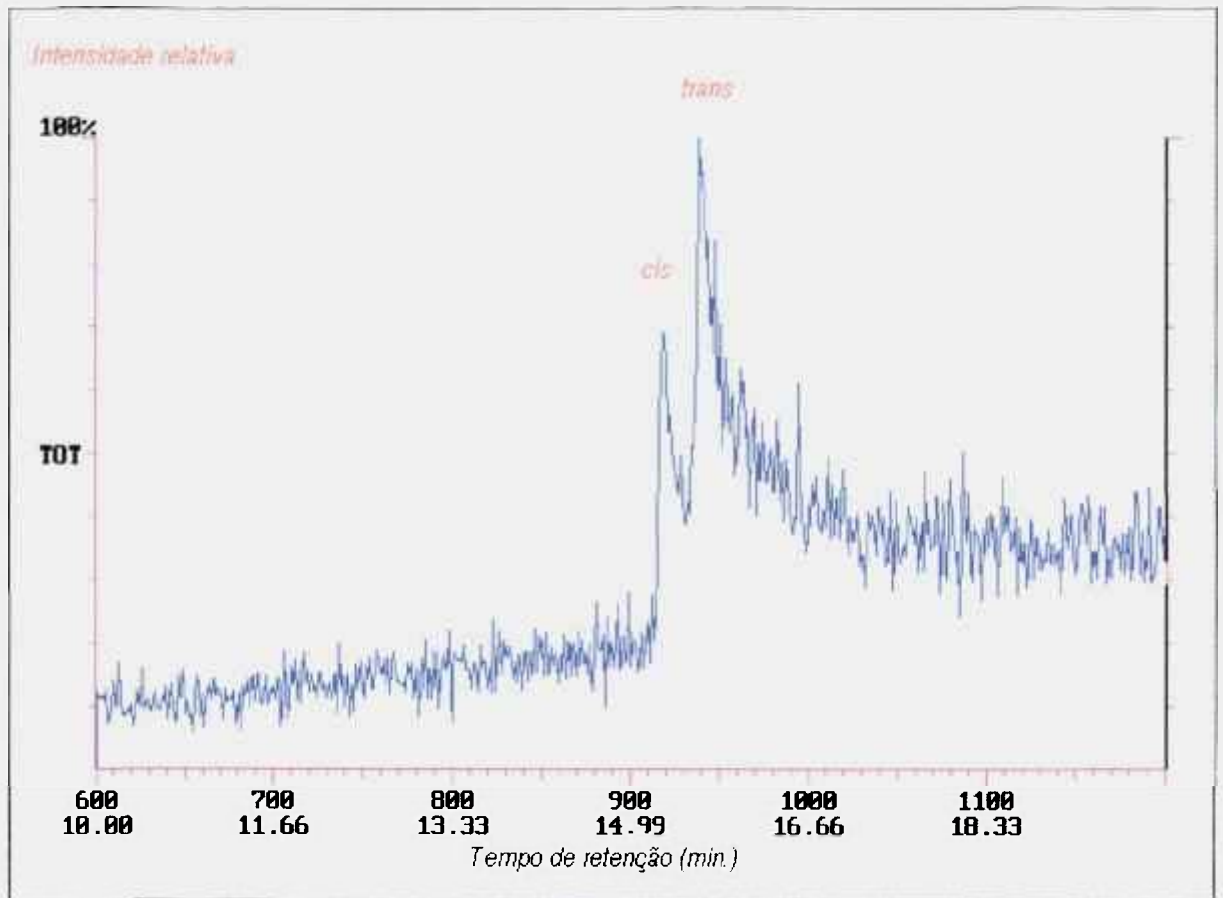


Figura 25. Picos cromatográficos da Permetrina no modo de ionização química, onde se observa os isômeros *cis* e *trans*.

O espectro de fragmentação da Permetrina, no modo de ionização química com metano, pode ser observado na Figura 26.

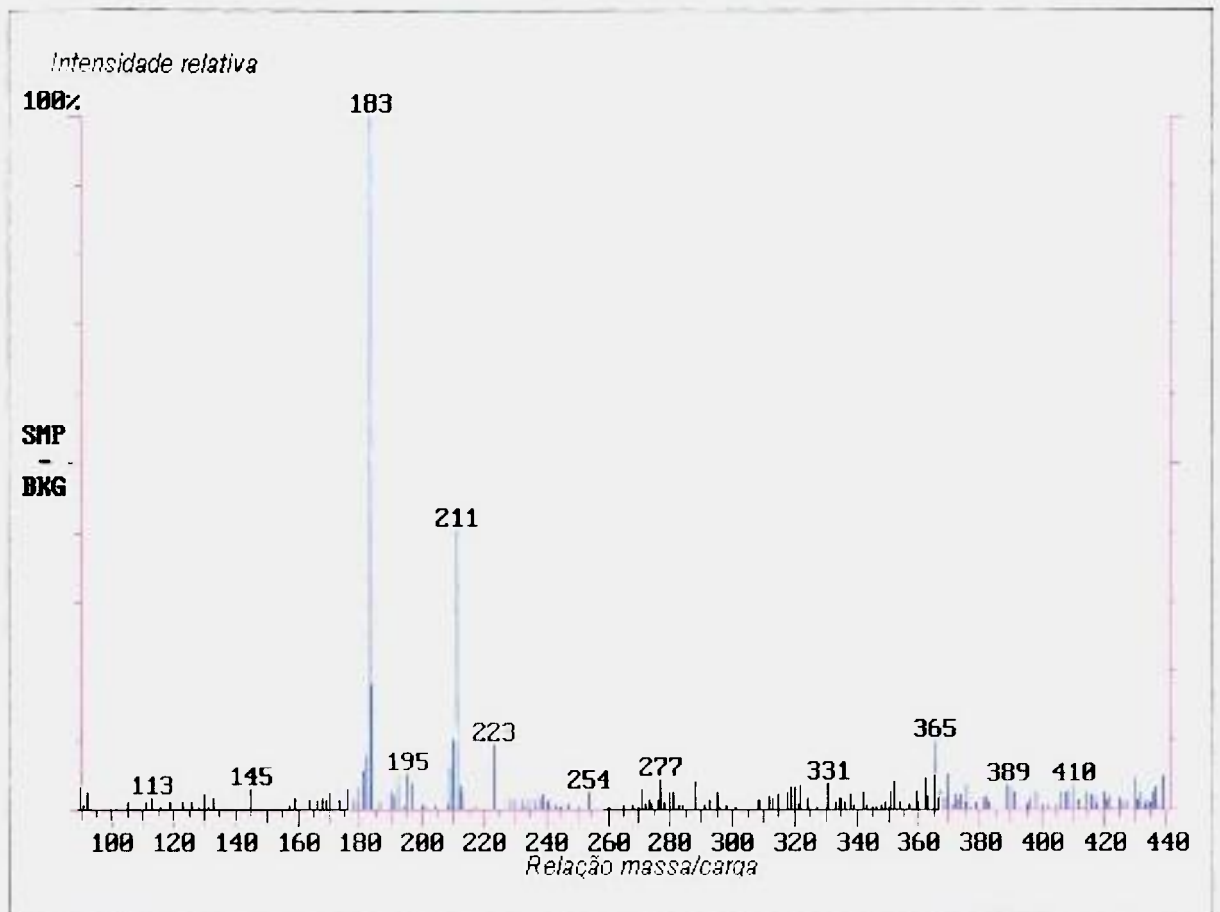


Figura 26. Espectro de fragmentação de um dos isômeros da Permetrina no modo IQ utilizando-se Metano como gás reagente.

Observamos que neste processo a fragmentação básica ocorre também na ligação éster na qual são produzidos os íons com m/z 183 e 211. O íon com m/z 211 é resultado da formação de um “cluster” entre o íon $C_2H_5^+$, produzido pelo metano, e o fragmento 183. O processo de formação do espectro é apresentado na Figura 27.

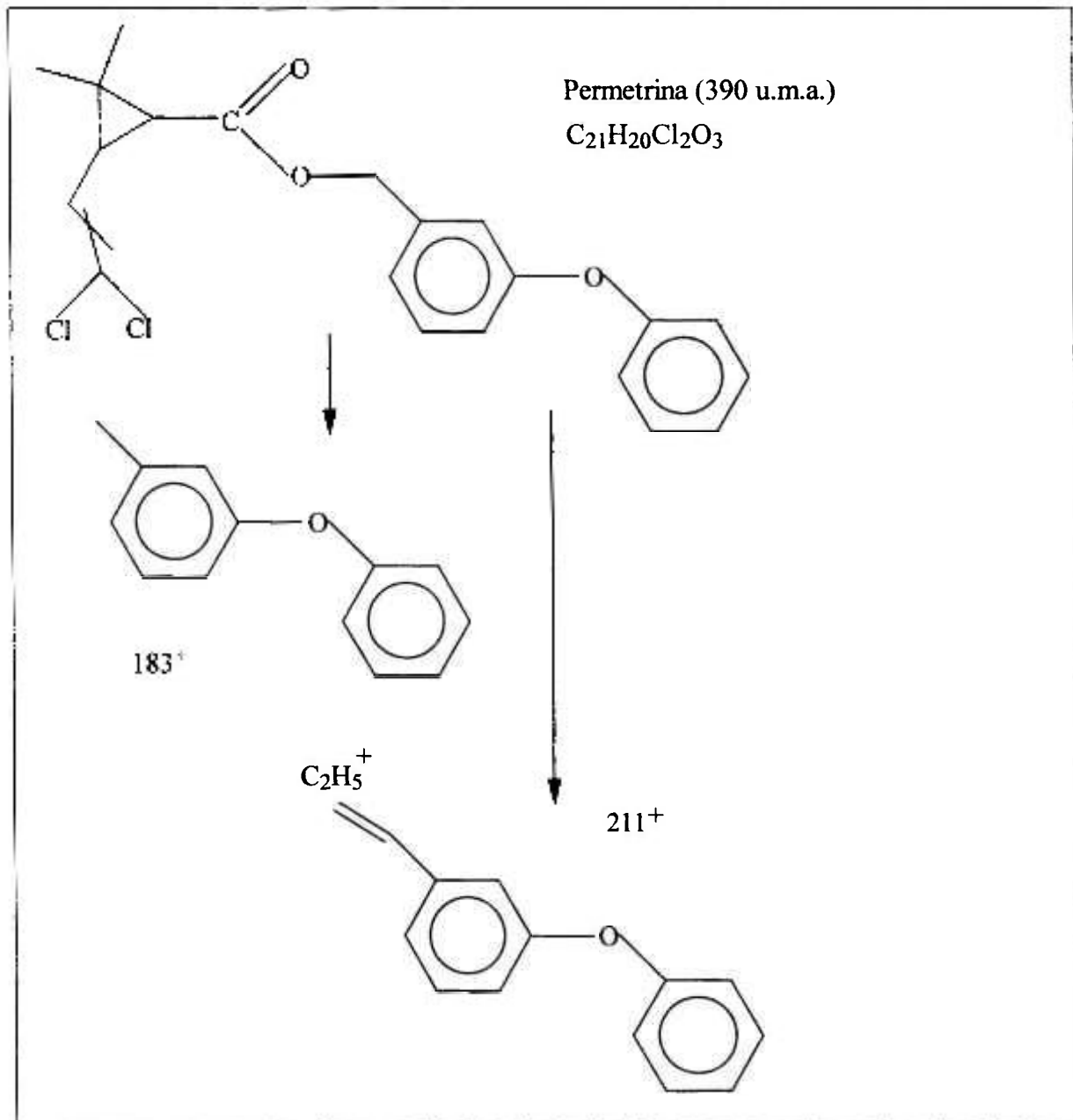


Figura 27. Sugestão para a origem do espectro de fragmentação da Permetrina no modo IQ.

Ainda no espectro de massa no modo de IQ (Figura 26) observa-se a existência do íon com m/z 365. Este íon é provavelmente originário da formação de um dímero protonado, ou seja, o dímero em questão seria formado por dois fragmentos 183⁺ subtraídos de um H⁺ (Figura 28).

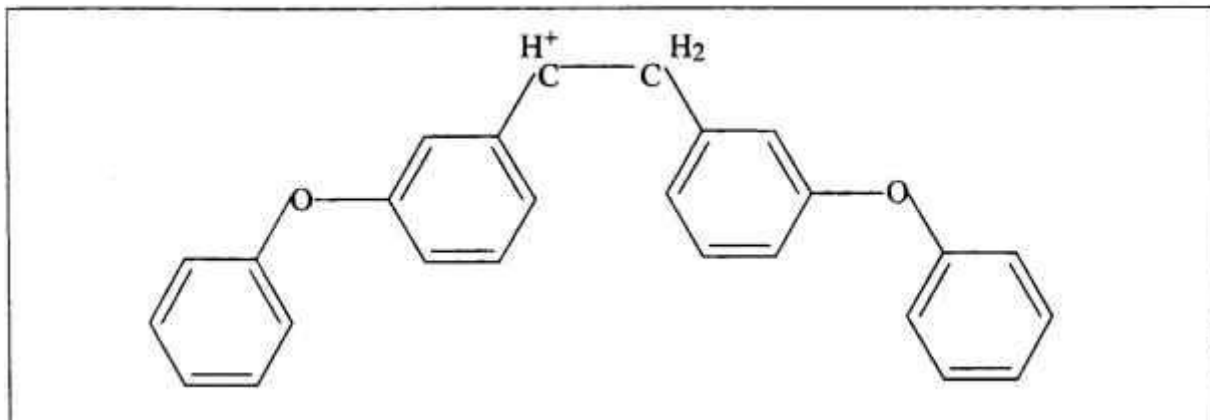


Figura 28. Possível dímero, de m/z 365, formado pela união de dois fragmentos de massa 182 e um próton no espectro de massa da Permetrina (modo IQ).

Comparando-se os espectros de IE e IQ referentes às Figuras 23 e 26 respectivamente, observa-se um aumento de intensidade medida em CIR (Corrente Iônica Relativa) para a Ionização Química relativamente à ionização por Impacto de Elétrons. No íon com m/z 183, que corresponde ao pico base (pico mais intenso) em ambos os espectros, observamos um aumento de intensidade na proporção 10:1. No pico molecular (390 u.m.a.) observamos um aumento de um fator 26:1 no qual as intensidades foram respectivamente $I_{IQ} = 11321$ CIR e $I_{IE} = 440$ CIR (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação entre íons mais intensos para dois espectros em modos de aquisição diferentes (IE e IQ).

Massa Iônica	Intensidade Iie (cir)	Intensidade Iiq (cir)	Iiq / Iie
	Impacto de Elétrons (Área)	Ionização Química (Área)	
183 ⁺	32504	348827	10,73
163 ⁺	7319	-----	-----
165 ⁺	6748	-----	-----
91 ⁺	6518	-----	-----
127 ⁺	5133	-----	-----
77 ⁺	5061	-----	-----
184 ⁺	4943	44576	9,02
128 ⁺	2665	-----	-----
153 ⁺	2580	-----	-----
168 ⁺	2580	6368	2,47
211 ⁺	79	162031	2051,02
223 ⁺	249	31840	127,87
182 ⁺	-----	27595	-----
181 ⁺	1431	16274	11,37
543 ⁺	-----	16981	-----
365 ⁺	164	14151	86,29
209 ⁺	466	18397	39,48
210 ⁺	105	16981	161,72

Na aquisição de dados, foram estudados vários parâmetros experimentais tais como: programação da coluna cromatográfica, temperatura de injetor, temperatura do detector, modo de ionização entre outros. De maneira geral observa-se grandes variações de intensidade em função da programação de temperatura cromatográfica, temperatura de injetor, temperatura da linha de transferência, temperatura de detector, pressão do gás de arraste e pressão do gás reagente. Fixando-se estes parâmetros, verificamos que o modo de Ionização Química fornece picos mais intensos relativamente ao modo por Impacto de Elétrons. No entanto a relação sinal/ruído é muito mais favorável no que diz respeito ao modo por Impacto de Elétrons em relação à Ionização Química como se pode observar pela Tabela 6.

Tabela 6. Dados obtidos para concentrações de 100 ppm de Permetrina dissolvida em diclorometano.

Modo de ionização	Volume I (μL)	Isômero <i>cis</i> (cir)	Isômero <i>trans</i> (cir)	Relação Sinal/Ruído	Relação Sinal/Ruído
		Área	Área	Isômero <i>cis</i>	Isômero <i>trans</i>
IQ	1	2839731	2845949	34,5	7,7
IQ	1	5013144	5604084	44,2	7,6
IQ	1	2760945	2932386	23,5	8,7
IE	1	213518	265830	646,6	9,5
IE	0,5	145295	227220	705,3	21,4
IE	0,25	28095	32476	127,3	11,7

As intensidades (Áreas) da Tabela 6 foram obtidas considerando-se apenas os três íons mais característicos da Permetrina e fazendo-se uso da Monitoração de Íons Seleccionados (MIS) de maneira a diminuir a influência do substrato da matriz iônica coeluyente. Para Ionização Química foram seleccionados os íons com m/z 183, 211 e 365 enquanto que na Ionização por Impacto de Elétrons foram seleccionados os íons com m/z 127, 163 e 183.

VI. 2. Permetrina e metabólitos

A constatação de que o limiar de clivagem na ligação éster é bastante baixo, inclusive ocorrendo no modo de ionização química, nos leva a supor que a Permetrina, quando metabolizada, sofre clivagem preferencialmente nesta ligação. Isto pode ser verificado, observando-se os principais produtos metabólicos resultante da clivagem eletrolítica da ligação éster seguida por oxidação (Figura 29), processo no qual são produzidos o ácido *trans*-3-(2,2 diclorovinil)-2,2-dimetil-ciclopropanocarboxilato (DCCA) e o ácido 3-fenoxibenzoico (3-PBA). Estes metabólitos são parcialmente conjugados pelo ácido glucurônico e finalmente eliminados renalmente [67].

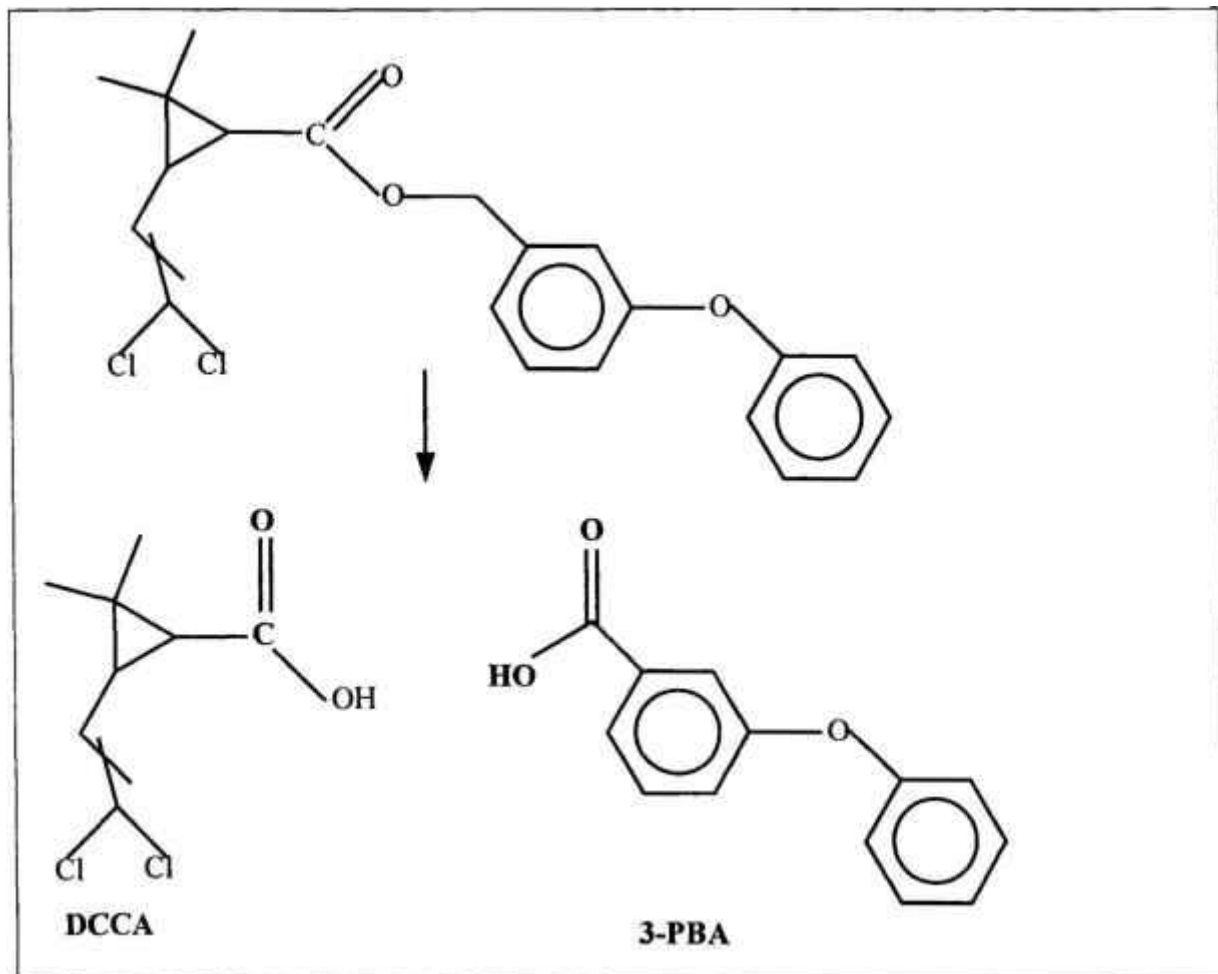


Figura 29. Principais metabólitos do Piretróide Permetrina.

Portanto, o espectro de massas nos dá uma clara indicação do sítio no qual ocorrerá a reação, mesmo em condições químicas distintas das quais foi obtido o espectro de massas. Note ainda que em ambos os espectros de massas, IE e IQ, o pico molecular não é observado. Este fato é compatível com a fácil metabolização da Permetrina, processo no qual a molécula não é preservada após a ingestão por mamíferos em função da fragilidade da ligação éster. Isto explica a baixa toxicidade deste composto para mamíferos relativamente aos insetos, pois os últimos não possuem um mecanismo biológico capaz de degradar rapidamente a Permetrina antes que a mesma atinja o sistema nervoso e altere a permeabilidade das células nervosas no que concerne aos canais de sódio.

VI. 3. Espectros de massa da Cipermetrina

Neste item apresentamos os cromatogramas e espectros de massa do Piretróide Cipermetrina nos modos de ionização por impacto de elétrons e ionização química com Metano, bem como os possíveis caminhos de fragmentação que levam à formação destes espectros. Indicamos ainda a correlação existente entre clivagem preferencial da ligação éster e a fácil metabolização do Piretróide Cipermetrina em mamíferos.

VI. 3-1. Separação dos componentes da amostra via cromatógrafo a gás

Independentemente da detecção dos fragmentos iônicos pelo espectrômetro de massas de armadilha iônica, o processo de eluição é de crucial importância na separação adequada dos componentes da amostra. A temperatura do injetor constitui-se num parâmetro de grande importância, sendo imprescindível que a mesma tenha um valor próximo ou acima do ponto de ebulição do componente molecular de interesse. A otimização das intensidades iônicas nos levou a utilizar a seguinte programação de temperatura de coluna: Inicialmente manteve-se a temperatura a 50 °C por 2 minutos; em seguida elevou-se a temperatura de 50 a 240 °C por 8,01 minutos; manteve-se a temperatura a 240 °C por 9 minutos; elevou-se a temperatura de 240 a 260 °C em 3,22 minutos e manteve-se a temperatura a 260 °C por 8 minutos. As temperaturas de Injetor, Linha de Transferência e Detector foram 260, 270 e 170 °C respectivamente. O resultado da separação cromatográfica para Cipermetrina concentrada a 253 mg/L pode ser visualizado na Figura 30 sendo a aquisição de dados realizada no modo de ionização por impacto de elétrons (IE). O composto foi identificado via “software” do sistema, onde o espectro de massa obtido foi comparado com espectros fornecidos por um banco de dados NIST-1992.

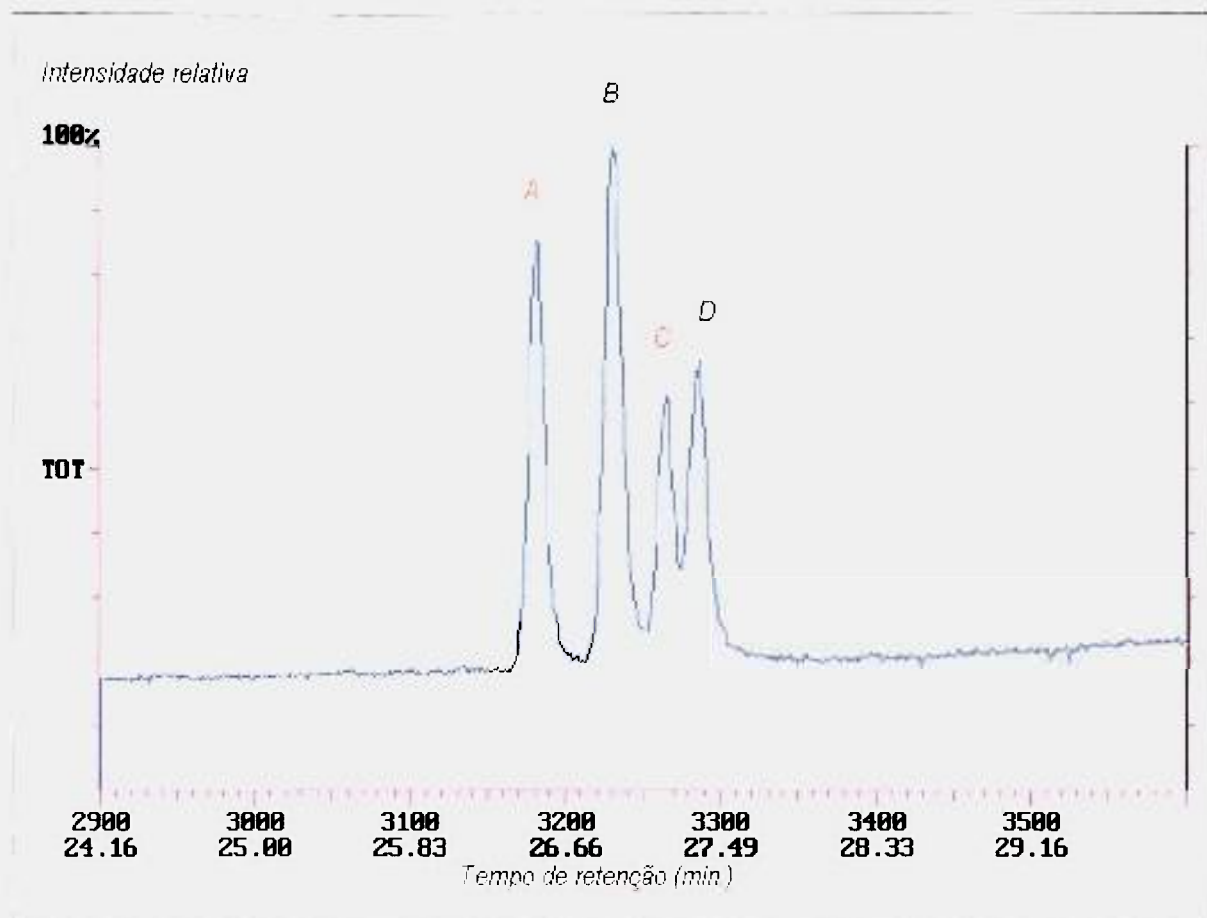


Figura 30. Cromatograma do Piretróide Cipermetrina no modo IE. Assinala-se a presença de quatro diastereômeros: *cis-1* (A), *cis-2* (B), *trans-1* (C) e *trans-2* (D).

Os diastereômeros A, B, C e D (Figura 30) foram eluídos em tempos de retenção respectivamente 26,41; 26,84; 27,12 e 27,29 minutos. Como fase móvel utilizou-se o gás Hélio com uma pressão de entrada na coluna de 12 psi. Os diastereômeros observados correspondem a quatro pares de enantiômeros designados respectivamente por *cis-1*, *cis-2*, *trans-1* e *trans-2* [45]. A boa resolução observada dos picos cromatográficos foi atingida através da diminuição do intervalo de tempo de varredura que, neste caso, foi de 0,5 segundos.

VI. 3-2. Impacto de elétrons (IE)

Na Figura 31 observa-se o espectro de massa correspondente a um dos isômeros do Piretróide Cipermetrina no modo IE. Verifica-se que a fragmentação mais intensa se dá na ligação éster, dando origem aos íons com m/z 207 e 208. Por sua vez, o íon, com m/z 207, perde CO_2 formando o fragmento com m/z 163. O íon, com m/z 207,

pode seguir um outro processo de fragmentação perdendo Cl_2C e incorporando H_2 formando o íon com m/z 127. O íon com m/z 208 pode se fragmentar de dois modos: perda do grupo ciano e fragmentação da estrutura fenoxi-fenila, levando à formação dos íons com m/z 91 e 77; perda de CN e Oxigênio e rearranjo estrutural levando à formação de um anel ciclopentânico (Figura 32).

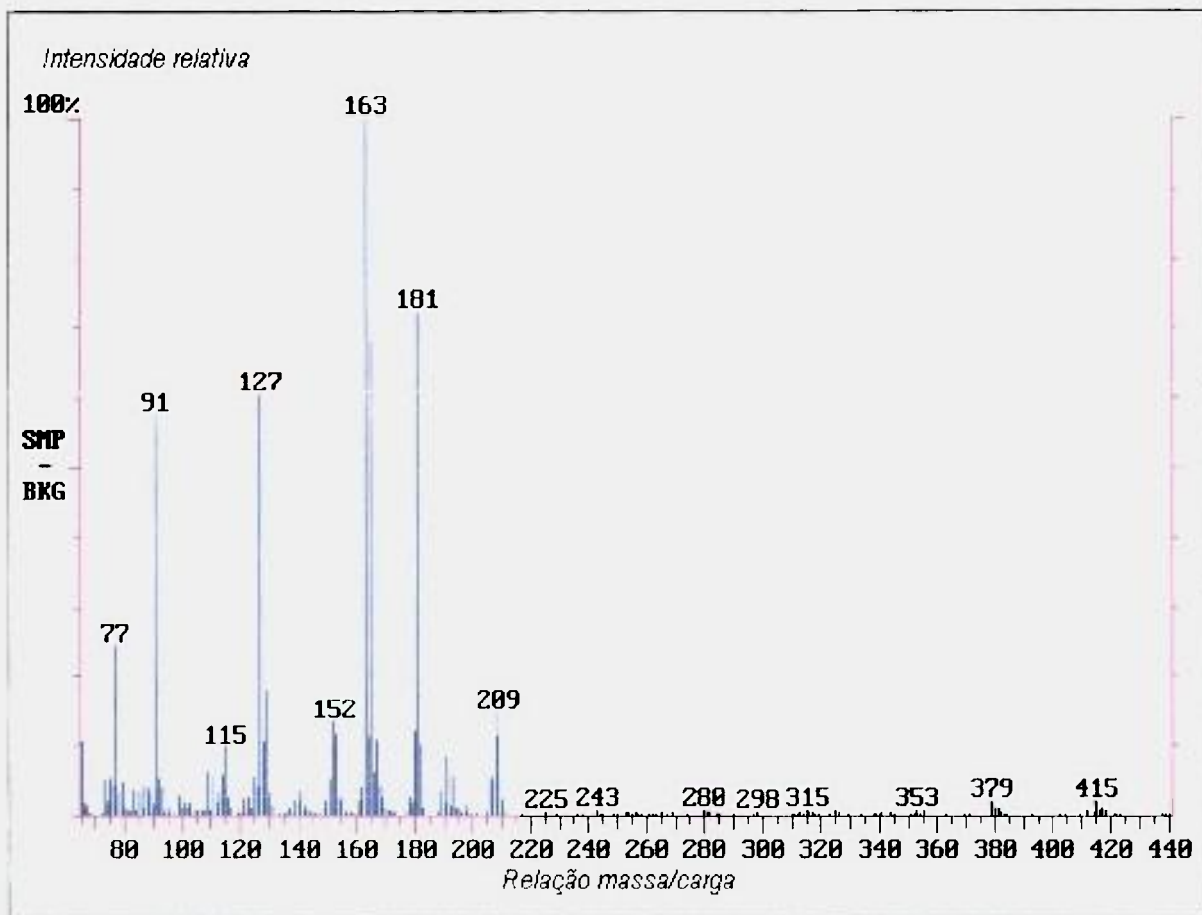


Figura 31. Espectro de massa correspondente ao Piretróide Cipermetrina, obtido no modo IE.

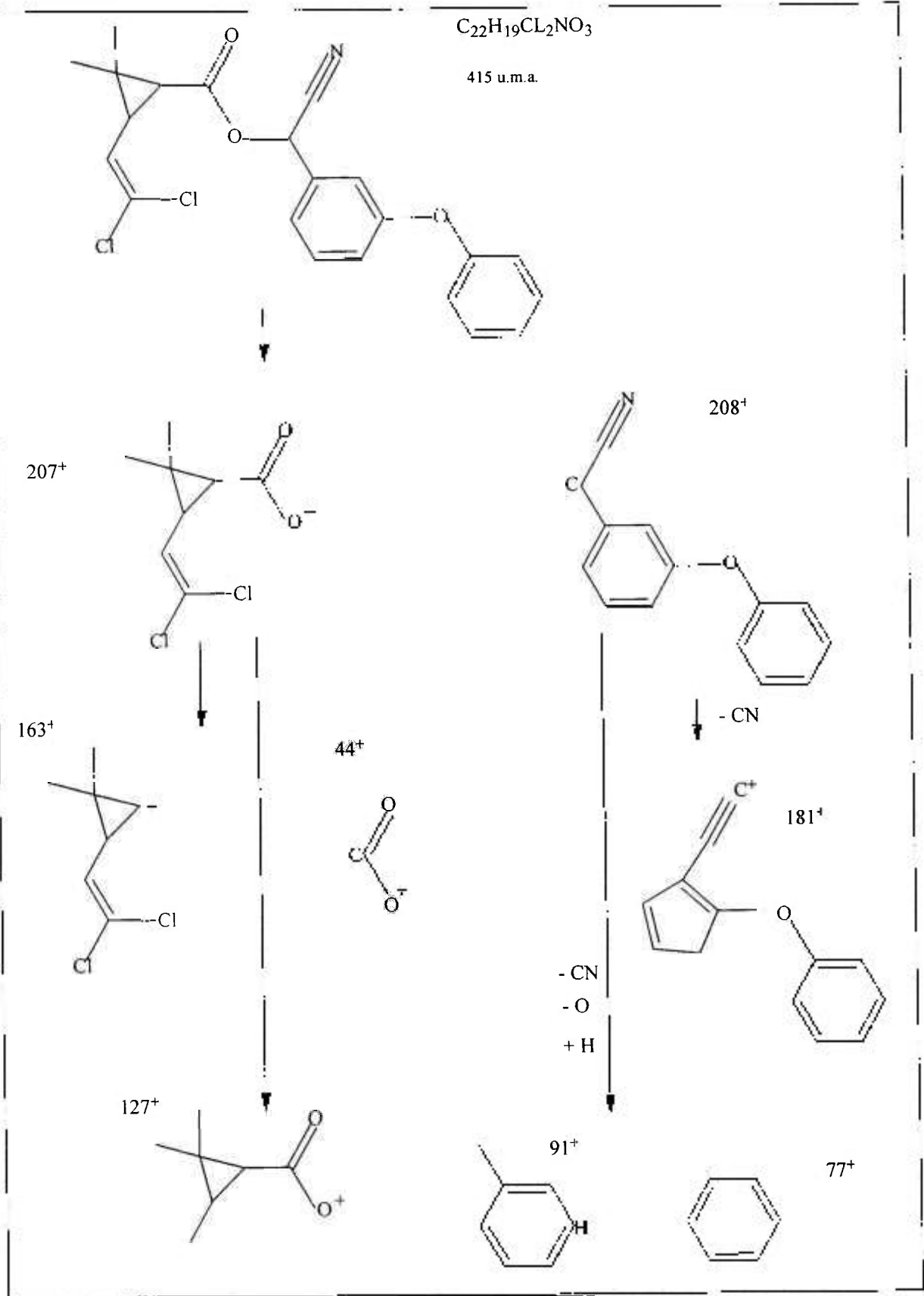


Figura 32. Sugestão para o espectro de fragmentação da Cipermetrina no modo IE.

VI. 3-3. Ionização química com metano

Na Figura 33 podemos observar o espectro de massa do composto Cipermetrina no modo de ionização química no qual os principais íons reagentes formados pela ionização e recombinação do CH_4 são os íons CH_5^+ e C_2H_5^+ . Verifica-se neste processo que a molécula de Cipermetrina se fragmenta nos íons com m/z 207 e 208. Por sua vez o íon com m/z 207 perde um oxigênio produzindo o íon com m/z 191 e o íon com m/z 193, correspondente à contribuição isotópica do ^{37}Cl . Uma fração do íon com m/z 207 forma um "cluster" com o cátion C_2H_5^+ , formando o íon com m/z 236 (Figura 34). Apesar da excessiva exotermicidade da reação, ainda podemos observar o íon molecular da Cipermetrina, com m/z 415 [58].

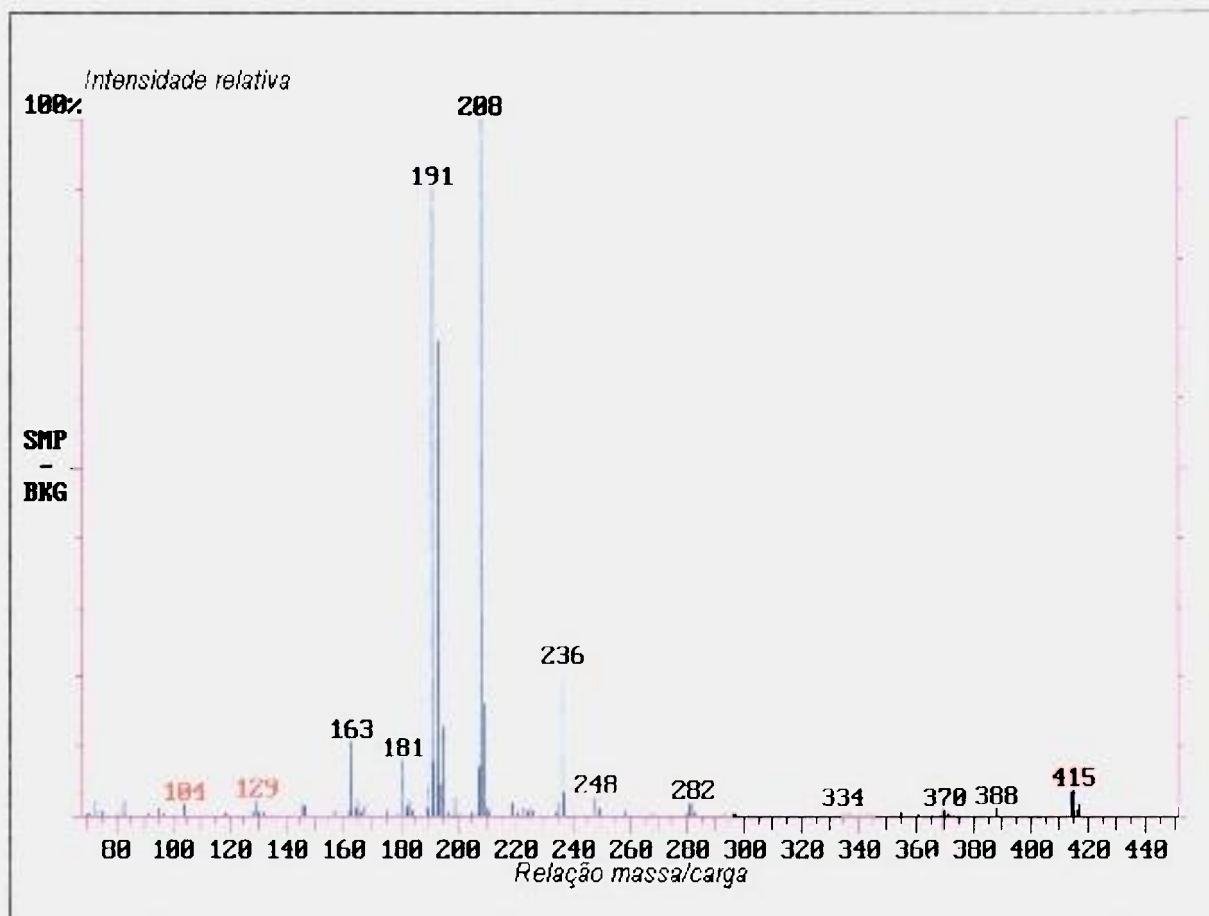


Figura 33. Espectro de massa da Cipermetrina, obtido no modo Ionização Química (IQ) com metano como gás reagente.

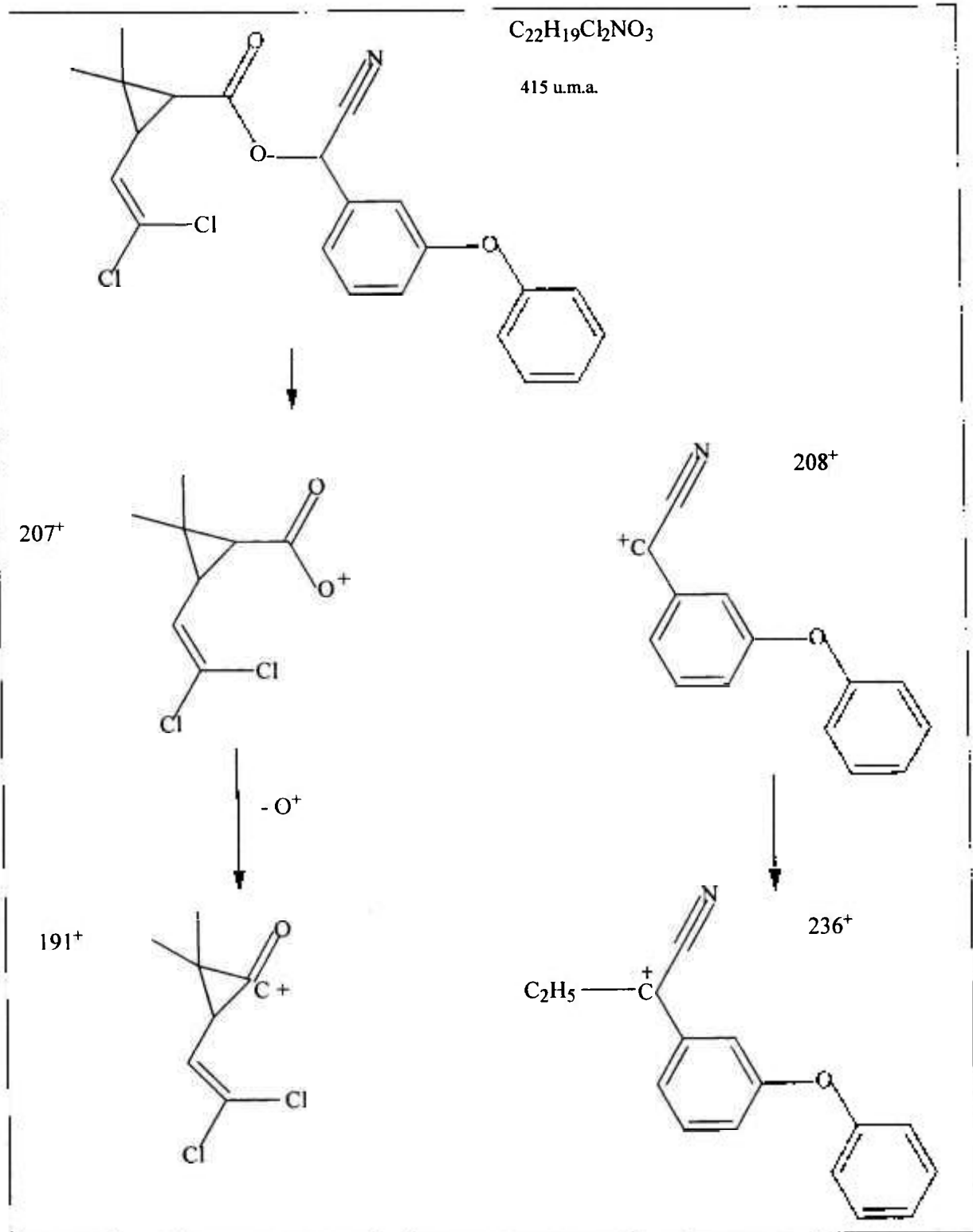


Figura 34. Sugestão para o espectro de fragmentação da Cipermetrina no modo IQ com metano como gás reagente.

A fragilidade da ligação éster pode ser constatada analogamente ao que ocorre com o Piretróide Permetrina. Similarmente, a Cipermetrina quando metabolizada [67] sofre clivagem na ligação éster produzindo os mesmos metabólitos da Permetrina (Figura 29) com a abstração do grupo ciano (CN) analogamente ao que ocorre na fragmentação por impacto de elétrons (Figura 31), e que produz o íon com m/z 181. Neste caso é possível também se prever quais serão os sítios de clivagem pela observação do espectro de massas do composto. A perda do grupo ciano é bastante conveniente, no que diz respeito à atividade dos Piretróides que contém este grupo, relativamente a mamíferos, visto que a presença deste grupo intensifica a atividade do Piretróide que o possui, provocando um prolongamento dos blocos de impulsos nervosos. Inversamente, o efeito sobre insetos, que se constituem nos alvos destes inseticidas, provoca um aumento do efeito tóxico destes pela indução de atividade repetitiva nos neurônios provocada pela presença do grupo ciano [68].

VI. 4. A extração: experimentos de recuperação

No capítulo V item 8 foi exposta a metodologia utilizada na extração e purificação de Piretróides em leite e produtos correlatos. Este método (cromatografia de adsorção), baseia-se na adsorção dos solutos sobre o material da coluna. Os solutos são eluídos por uma fase móvel sendo que os componentes menos facilmente adsorvidos são eluídos primeiramente enquanto que os mais prontamente adsorvidos são eluídos mais lentamente, efetuando-se assim a separação [69, 70]. Dois pontos são de especial importância na homogeneização da sílica-gel ativada com uma amostra de leite: a) O conteúdo de água deve ser otimizado. Se o conteúdo de água for excessivo o mesmo ultrapassará a capacidade de adsorção da coluna e portanto, parte do pesticida não será adsorvida causando perda do analito quando da eluição com o solvente. Por outro lado se o conteúdo aquoso for pequeno, as forças de adsorção superarão parcialmente a capacidade de extração da fase móvel (solvente); b) A amostra não deve conter mais do que 500 mg de gordura, correspondente à capacidade de purificação (clean-up) de 15 gramas da sílica gel com 10% em peso de água. Cabe aqui salientar que o leite é um sistema bastante complexo no qual a maior parte do conteúdo de gordura se constitui em triglicérides (98%) ocorrendo como glóbulos emulsificados que possuem diâmetros que vão de 3 a 4 μm . Os glóbulos são circundados por uma fina membrana que contém proteínas, fosfolípidios, enzimas, colesterol etc. No entanto, pode haver coalescência entre estes glóbulos provocando o surgimento de caroços. Estes caroços devem ser rompidos através da homogeneização em almofariz pois existe a possibilidade de parte dos pesticidas pouco polares ou apolares ficarem retidos na fase lipofílica destes agregados globulares [71].

Nos experimentos de recuperação foram utilizados os leites tipo B integral pasteurizado da marca LECO e em pó integral marca Great Value comercializado pela Wall Mart. O experimento consiste em misturar ao leite e a sílica-gel, uma quantidade do Piretróide dissolvido em 2 ml de n-hexano de maneira quantitativa. A amostra é eluída com o solvente diclorometano-n-hexano (1:1), ocorrendo neste procedimento a extração e a purificação. A amostra resultante no fim da coluna (Solventes + Piretróide) é concentrada (evaporada) através de um roto-vapor e completada a 10 ml com n-hexano. Estabelece-se uma temperatura de cerca de 71 $^{\circ}\text{C}$ no rotovapor sem a utilização de vácuo. O frasco no qual é introduzida a amostra deve girar a cerca de 30 rotações por minuto, o que garante o aquecimento homogêneo da amostra e previne a ocorrência de “explosões ocasionais”. Dessa forma, todo o diclorometano é evaporado e a amostra é concentrada em

cerca de 8 ml somente em n-hexano. Experimentos realizados mostram que o rendimento, considerando-se apenas a etapa de evaporação em roto-vapor, é de 100%, não sendo possível atribuir a esta etapa uma possível ineficiência no rendimento da extração e purificação. A amostra é completada, com este mesmo solvente, a 10 ml. A concentração teórica será igual à massa inicial introduzida, diluída num volume 10 ml de n-hexano. O eluente utilizado é levemente polar em vista da necessidade de se extrair Piretróides que são compostos, em geral, pouco polares. Isto fica evidenciado para a Cipermetrina (utilizada neste procedimento de extração), pela presença do grupo ciano. A etapa de purificação é essencial, visto que todos os elementos levemente polares e apolares são co-extraídos ocasionando interferências quando da análise por GC/MS. A coluna de purificação reterá compostos de alto peso molecular, sobretudo compostos gordurosos e lipofílicos. O líquido resultante, quando suprimida a etapa de purificação, é fortemente amarelado pois pode conter lipídios, lactoses e/ou proteínas co-extraídas. Experimentos realizados com leite em pó, suprimindo-se a etapa de purificação, mostram a presença de um intenso pico de colesterol (Figura 35), composto este não especificado pelo fabricante, entre outros interferentes. Além disso também se observa um aumento substancial da intensidade da linha de base. De maneira geral, quanto menos intensa a coloração amarelada mais eficiente a purificação.

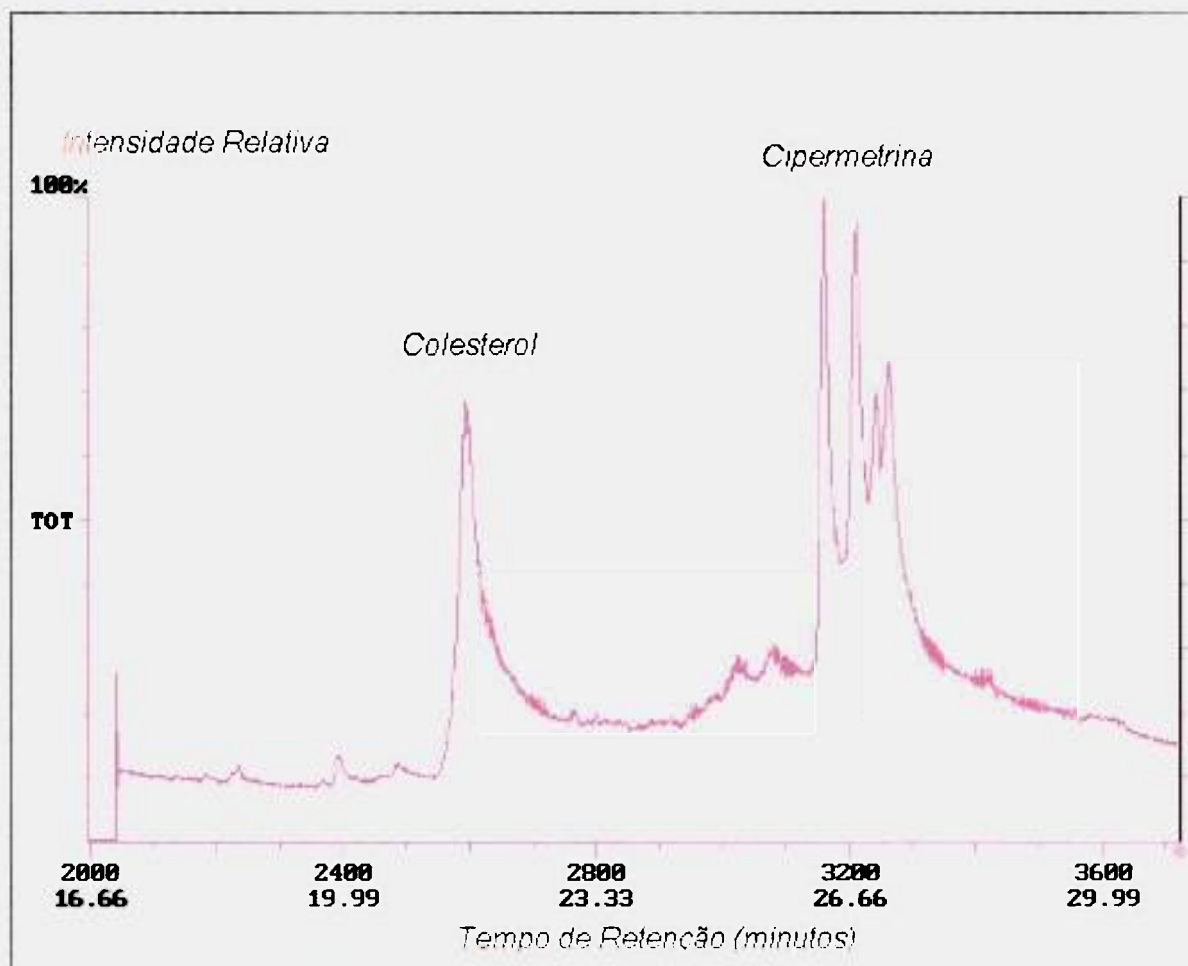


Figura 35. Cromatograma de resíduo da extração de cipermetrina em leite em pó realizado sem a etapa da purificação onde se observa a presença de colesterol, entre outros interferentes . Neste cromatograma, o conteúdo de Cipermetrina é de 130 mg/L.

Fizemos uso, nos experimentos de extração, de alguns procedimentos e etapas, nos quais foram acrescentadas pequenas quantidades do analito (“spiked”) de maneira a verificar a eficiência no procedimento de extração e purificação (“clean-up”).

Os experimentos de recuperação foram realizados de acordo com as seguintes etapas:

- a) Mistura do Eluente Diclorometano + N-Hexano, na proporção v/v de 1 para 1. Utiliza-se na eluição um total de 200 ml do eluente.
- b) Calcinação da sílica-gel 60 (70 a 230 mesh) a 500 °C por 2 horas e armazenamento em mufla a 130 °C.
- c) Para o “clean-up”, prepara-se uma mistura de 13,5 g de sílica-gel com 1,5 g de água destilada, ou seja, aproximadamente 10% em peso.

- d) A coluna na qual deve ser realizada a extração deve conter 15 g de sílica-gel desativada, cerca de 6 a 10 g de leite (no caso de leite em pó o mesmo já deve estar diluído em água e deve ser aquecido para melhor diluição) e uma certa quantidade do piretróide (“spike”) previamente pesada em balança analítica e posteriormente diluída em n-hexano.
- e) Homogeneiza-se com almofariz e pistilo a amostra acima até que se forme um pó livre fino.
- f) Opcionalmente, pode se utilizar Sulfato de Sódio Anidro Granulado com o intuito de se absorver quantidades excessivas de umidade. Neste caso o Na_2SO_4 deve ser aquecido a $300\text{ }^\circ\text{C}$ por 18 horas de tal forma que o mesmo seja ativado.
- g) A coluna de vidro, que tem altura de 52 cm e diâmetro interno de 2 cm, deve ser preenchida na seguinte ordem: Inicialmente coloca-se uma pequena quantidade de lã de vidro na base da mesma de modo a prevenir que a sílica-gel não intercepte os buracos pelos quais o extrato passará; a seguir coloca-se a sílica referente ao “clean-up”; posteriormente coloca-se o Sulfato de Sódio Anidro granulado; por fim coloca-se a coluna de extração. Deve-se garantir que a coluna esteja bem empacotada de tal forma que o eluente não seja retido em espaços porventura existentes.
- h) Após a eluição, que leva cerca de 2,5 horas, o frasco de pirex, no qual foi coletado o extrato, deve ser levado ao roto-vapor. No roto-vapor, com temperatura de $71\text{ }^\circ\text{C}$ e giro de 30 rotações/minuto, o eluído é evaporado e concentrado até um volume de cerca de 8 ml.
- i) Após a concentração o eluído é completado com n-hexano até um volume de 10 ml de tal forma que se possa quantificar a concentração do analito.
- j) Em seguida insere-se $1\mu\text{L}$ do extrato no GC/MS e coletamos os dados individuais.

Utilizamos as condições cromatográficas especificadas na Tabela 7.

Tabela 7. Condições cromatográfica utilizadas na análise do Piretróide Cipermetrina.

Início (°C)	Fim (°C)	Velocidade (°C/min)	Tempo (min)
50	50	0,00	2,00
50	240	23,70	8,01
240	240	0,00	9,00
240	260	6,20	3,22
260	260	0,00	8,00

Com tais condições, foram obtidos os picos cromatográficos mais intensos num tempo razoável de análise (30,23 minutos). As temperaturas de injetor, linha de transferência e detector foram respectivamente 260, 270 e 170 °C com o cromatógrafo no modo "splitless" e utilizando-se gás Hélio como gás de arraste, com uma pressão de 12 psi e fluxo de 30 ml/min na saída do cilindro. No Espectrômetro as razões massa/carga mínima e máxima detectável foram estabelecidas em 65 e 450 u.m.a., respectivamente. A razão de varredura foi de 500 ms e a voltagem do multiplicador de elétrons foi posicionada a 1500 Volts. Utilizou-se uma voltagem de modulação axial de 4 V e a uma frequência de 485 kHz que é cerca da metade da radio frequência de armazenamento que tem o valor de 1,1 MHz. A voltagem de modulação axial tem como função facilitar a ejeção iônica e assim, melhorar a resolução. Isto ocorre pois quando o íon esta para ser ejetado o mesmo entra em ressonância com esta voltagem e se move para longe do centro da armadilha iônica escapando do efeito da excessiva carga espacial no centro da armadilha.

VI. 5. Quantificação

A quantificação foi realizada utilizando-se padrões externos unitários ("single-point"). Estes padrões, que consistem no mesmo composto extraído e correspondem a uma extração teórica de 100% de rendimento. Exemplificando para a Cipermetrina, o cálculo é feito da seguinte forma: Parte-se de uma concentração de, digamos, 550 ppm, que corresponde a 0,55 mg/ml, contida num balão de 10 ml. Retira-se com uma pipeta uma alíquota de 2 ml, que corresponde em massa a 1,1 mg de Cipermetrina. Após a extração e concentração o conteúdo teórico, supondo um rendimento de 100%, será de 1,1 mg de Cipermetrina por 10 ml de n-hexano. Portanto, obteremos no final uma concentração de

1,1 mg/10 ml ou 0,11 mg/ml do analito em n-hexano. Tanto os padrões como as amostras dos extratos coletados são analisadas de 4 a 5 vezes com o GC/MS e são calculadas, em todas as análises, as médias e desvios padrão das medidas. Os cromatogramas totais que são obtidos no modo de impacto por elétrons, carregam contagens de elementos coeluentes da matriz, tanto na linha de base como em picos. Para que o efeito da matriz coeluyente seja minimizado utilizou-se a técnica cognominada monitoração de íons selecionados (MIS) na qual, através da manipulação de dados “off-line”, é obtido um cromatograma formado pela contribuição apenas dos três íons mais intensos do analito considerado. O cromatograma gerado com este recurso, tem a propriedade de eliminar a maioria dos íons dos compostos coeluentes. No caso do Piretróide Cipermetrina este recurso é essencial na aquisição dos dados de intensidade dos picos cromatográficos visto que é possível se isolar o composto de interesse, por exemplo o isômero A da Cipermetrina, de um composto interferente tal como o Esqualeno ($C_{30}H_{50}$), não totalmente eliminado na purificação do leite, que elui com um tempo de retenção de 26,49 min, praticamente coincidente com o primeiro isômero do analito ($t_r = 26,51$ min.) (Figura 36). No caso da Cipermetrina pode-se escolher os íons com m/z 127, 163 e 181, que correspondem aos íons mais intensos no espectro de massa por impacto de elétrons (Figura 37). Também o interferente Esqualeno pode ser perfeitamente separado do espectro total selecionando-se os íons com m/z 69, 81 e 95 (Figura 38). A partir do Cromatograma no modo AIS, é possível obter-se as áreas dos respectivos picos e correlaciona-las com suas respectivas concentrações.

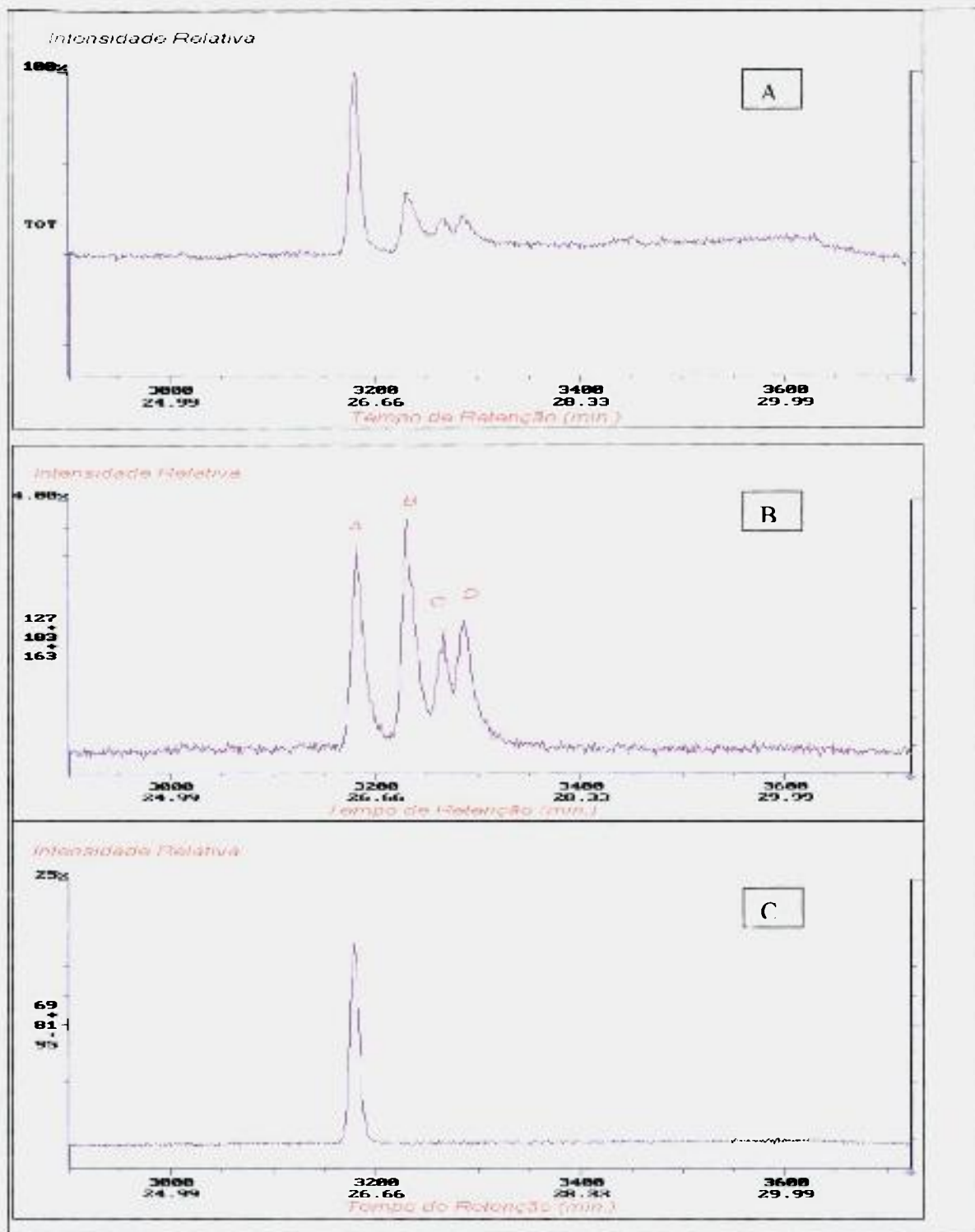


Fig. 36. No cromatograma A observamos a varredura total, correspondente à extração de Cipermetrina em Leite (110 ppm). No cromatograma B observamos apenas a contribuição dos íons 163^+ , 127^+ e 181^+ (Figura 37). No cromatograma C observamos apenas o interferente Esqualeno considerando as contribuições apenas dos íons com m/z 69, 81 e 95^+ (Figura 38).

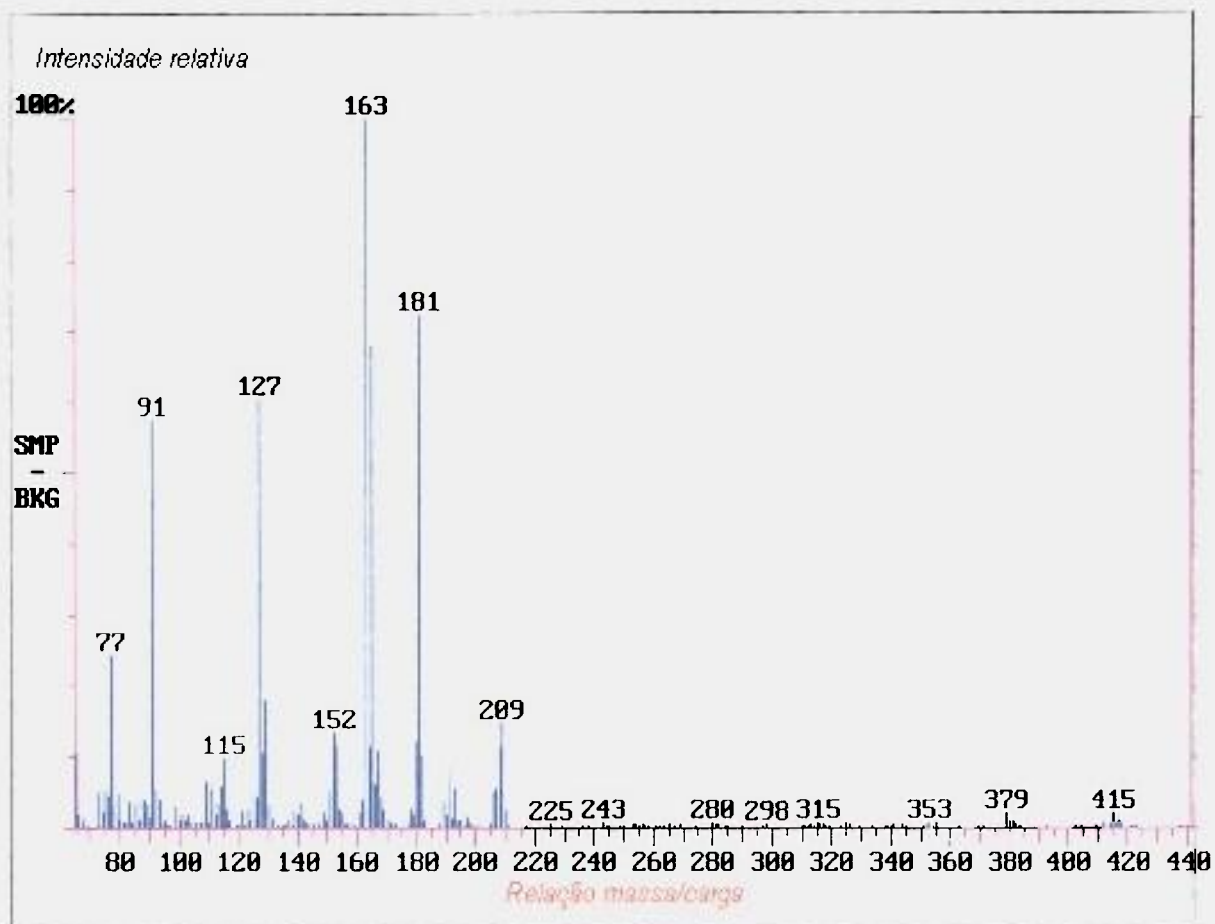


Figura 37. Espectro de Massa do Piretróide Cipermetrina no modo IE, onde se observam os íons do espectro de fragmentação por impacto de elétrons cujos íons mais intensos são os com relação m/z 127, 163, 165 e 181.

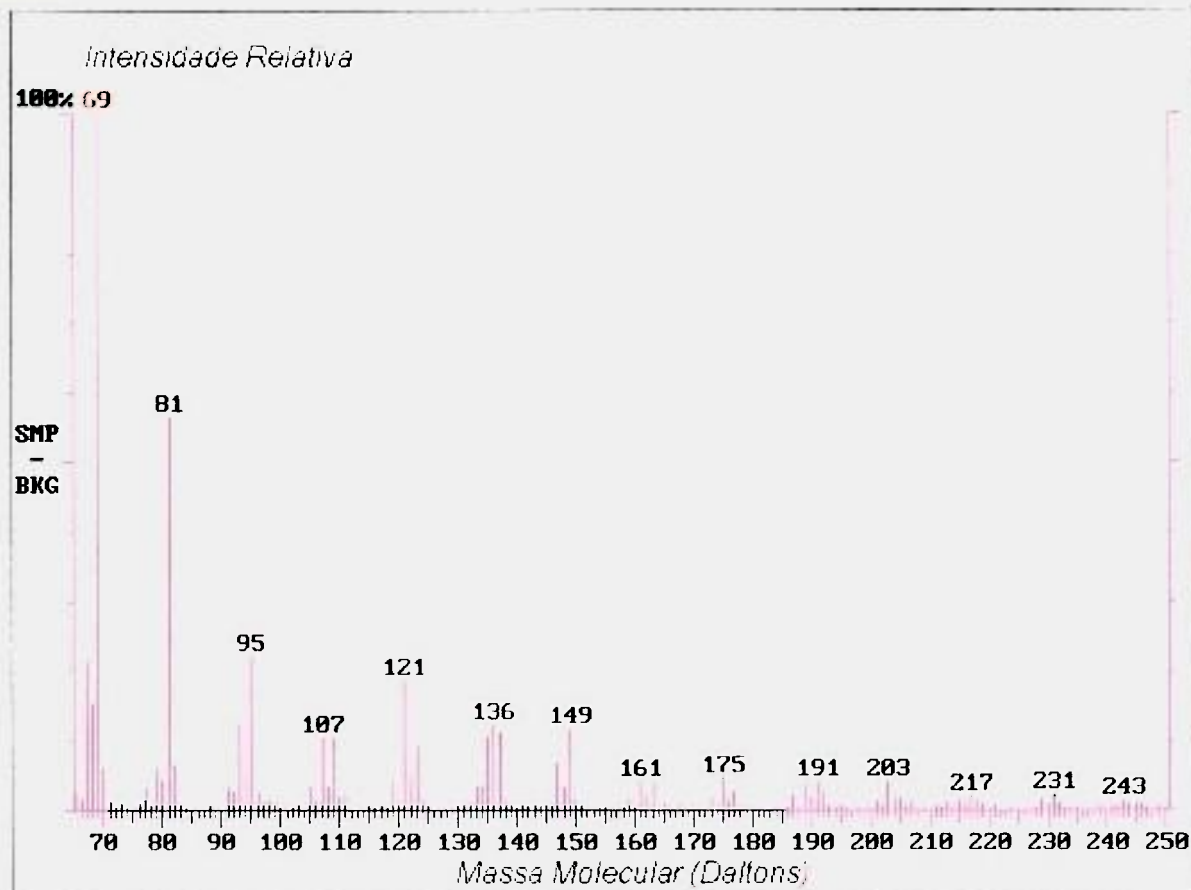


Figura 38. Espectro de Massa do composto Esqualeno no modo IE, onde se observam os 3 íons mais intensos, com m/z 69, 81 e 95.

Observa-se que este recurso difere do modo AIS (secção III.5), no qual íons indesejáveis são eliminados da armadilha iônica durante a aquisição dos dados. A quantificação no modo MIS é feita calculando-se, através de recursos computacionais de integração, as respectivas áreas do pico de melhor separação, no caso de existirem isômeros. Neste procedimento, a linha de base é determinada manualmente e a área do pico é calculada pelo programa integrador (Figura 39).

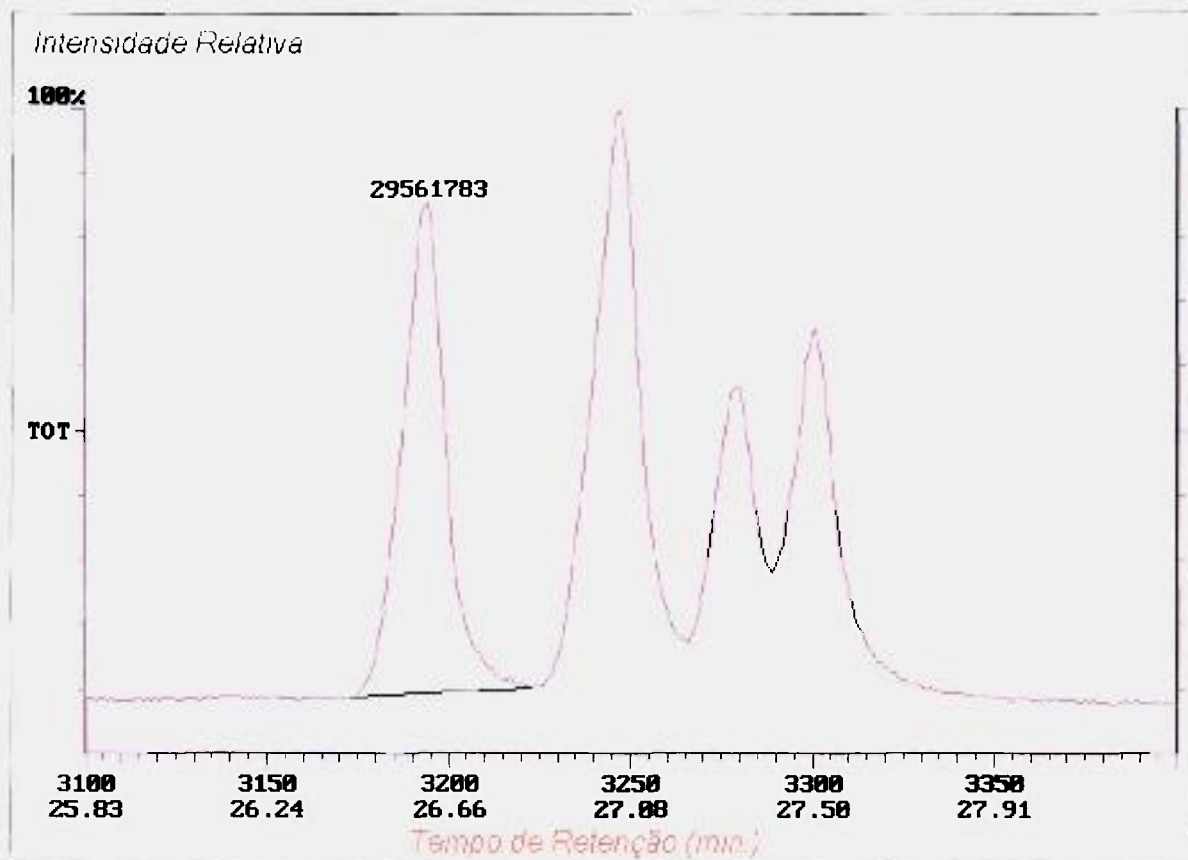


Figura 39. Exemplo do cálculo da área do isômero A do Piretróide Cipermetrina. A linha de base é determinada manualmente e a área (29561783 CIR) é calculada pelo programa integrador. A unidade CIR é definida como a corrente iônica relativa.

A recuperação média em experimentos de extração, calculada em porcentagem pode ser definida como:

$$R = \frac{A_E}{A_P} \cdot 100\% \quad (6.1)$$

Onde R= Recuperação

A_E = Média das Áreas do Pico do Extrato e

A_P = Média das Áreas do Pico do Padrão

Podem existir algumas fontes de erro quando da quantificação dos compostos Piretróides, quais sejam:

- a) A alteração do fluxo do gás de arraste altera a eficiência da eluição no Cromatógrafo Gasoso, levando a modificações nas intensidades dos picos e nos tempos de retenção;
- b) A injeção manual é de difícil reprodutibilidade; existem incertezas na visualização de 1 μL , quando medido manualmente com uma seringa graduada;
- c) Existem variações nas condições termodinâmicas do sistema GC/MS;
- d) A presença de umidade no interior do sistema leva a aumentos da linha de base e má resolução dos picos. Os dois últimos itens nos levam a realizar os experimentos de quantificação de extrato e padrão num mesmo dia e alternadamente de tal forma a minimizar estes efeitos.

Para que a quantificação externa do tipo “single-point” seja válida, é necessário que o comportamento da resposta do espectrômetro em função da concentração do analito seja linear. Em vista deste fato, procedemos à aquisição de dados para o Piretróide Cipermetrina em várias concentrações (11, 44, 88, 110, 165, 220, 550 mg/L) do analito diluído em n-Hexano HPLC, e verificamos a resposta em área, ou mais propriamente, a Corrente Iônica Relativa (CIR) (Figura 40).

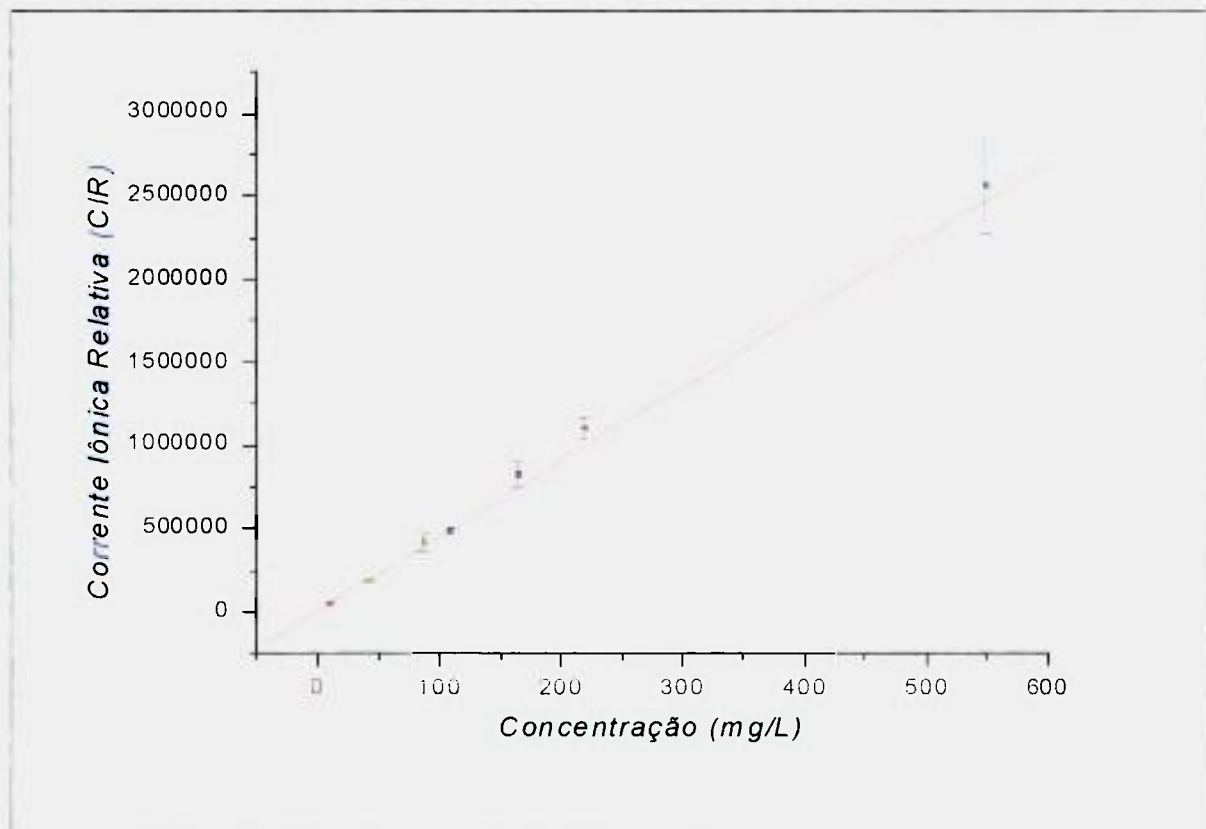


Figura 40. Comportamento linear da resposta do Espectrômetro de Massa em função da concentração do Cipermetrina.

O ajuste relativamente aos dados obtidos foi realizado através do método de mínimos quadrados pelo qual ajustou-se uma reta. A reta de interpolação nos dá um coeficiente de correlação de Pearson de 0,99822, valor este que demonstra uma correlação linear altamente positiva. A reta de regressão é dada pela equação:

$$CIR = -1070,92 + (4492,31)C \quad (6.2)$$

onde *CIR* é a corrente iônica relativa e *C* é a concentração da amostra em unidades de massa por volume.

VI. 6. Evitando contaminação

Para que os dados experimentais sejam confiáveis, especialmente no que diz respeito à constatação da presença do pesticida no leite e à sua quantificação, a limpeza da vidraria consiste numa etapa essencial. A vidraria deve ser escrupulosamente lavada, especialmente quando usada para análise de traços. Deixa-se a vidraria de molho em uma solução de detergente não fosfórico. Lava-se bem com uma escova, limpa-se com água de torneira e, logo depois, limpa-se com água destilada algumas vezes. Sendo a vidraria não graduada, aquecemo-la em uma mufla a 110 °C durante pelo menos 12 horas. Um procedimento mais efetivo é a lavagem com sulfocrômica, que consiste em 1 L de H₂SO₄, 100 mL de H₂O e 200 de K₂Cr₂O₇. Neste caso a vidraria deve ser submersa em banho num período de 1 a 2 dias de tal forma que todas as impurezas sejam removidas.

Outro fator que pode provocar contaminação da amostra consiste no uso de seringas. Procedemos ao estudo do resíduo deixado na seringa após a injeção de 1 µL de um padrão de Permetrina (50 mg/L) diluído em n-hexano. A Tabela 11 mostra a variação da concentração do analito após rinsagens contínuas com n-hexano. Dos dados da Tabela 8.

Tabela 8. Variação da eliminação de Permetrina em função do número de lavagens efetuadas com n-hexano em microseringa.

Número de Lavagens	Concentração restante de Permetrina (mg/L)
50	1,1
50	0,36
50	0,23
50	0,20
100	Não detectado

deduz-se que são necessárias pelo menos 300 lavagens para eliminar o analito da microseringa em questão.

Para a quantificação do Piretróide procedemos à construção da curva de calibração para a Permetrina utilizando as concentrações 0,51; 5,1; 15,3 e 51 mg/L. A curva em questão (Figura 41) foi construída utilizando-se dados de áreas no cromatograma os quais foram quantificados monitorando-se 3 íons extraídos do cromatograma total, quais sejam: 127^+ , 163^+ e 183^+ .

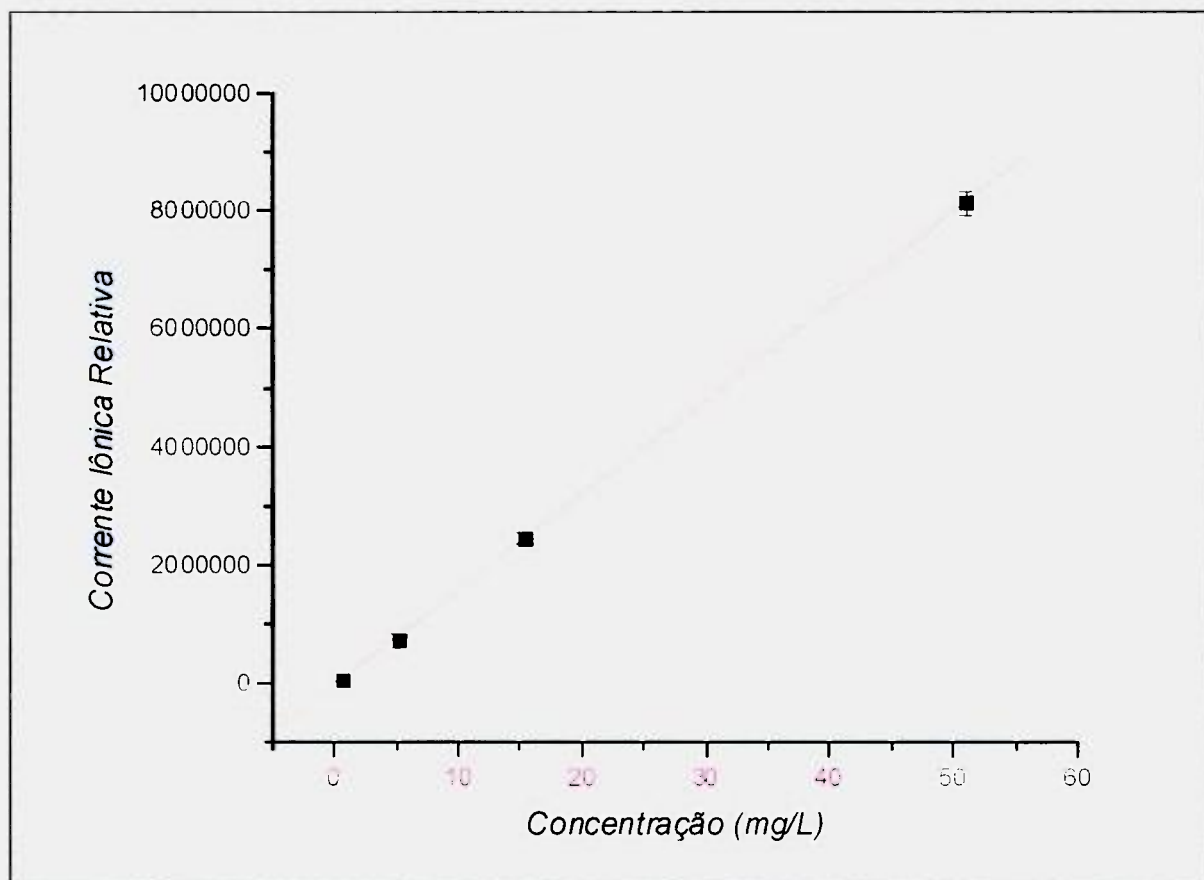


Figura 41. Comportamento linear da resposta do Espectrômetro de Massa em função da Concentração do Permetrina.

O ajuste da reta através do método de mínimos quadrados nos dá um coeficiente de correlação de 0,99991, sendo a reta de regressão calculada pela equação:

$$CIR = -25500,81 + (160103,77)C \quad (6.3)$$

onde *CIR* é a corrente iônica relativa e *C* é a concentração da amostra em unidades de massa por volume. O desvio padrão tem o valor de 0,4236. Com base nesta equação linear calculamos as concentrações desconhecidas de Permetrina.

Outro procedimento essencial e que deve ser realizado antes de qualquer aquisição de dados do extrato a ser analisado, consiste na análise via GC/MS do solvente puro, de forma a garantir que não existam contaminações no mesmo. A extração em si, deve ser previamente realizada com o leite puro, sem o acréscimo do Piretróide. O extrato assim obtido, deve ser analisado pelo sistema GC/MS de tal forma que se obtenha um cromatograma que represente o “branco” do sistema e no qual possam ser observados os componentes interferentes.

VI. 7. Recuperação da Cipermetrina em leite em função do conteúdo de água

Nesta etapa realizamos experimentos de recuperação de Cipermetrina em leite em pó. O leite em pó nos dá a possibilidade de realizar experimentos nos quais é possível controlar a quantidade de água na mistura e com isto verificar a variação deste parâmetro em relação à eficiência da extração. Na Tabela 9 listamos os dados de recuperação do Piretróide Cipermetrina (253 mg/L) em função do conteúdo de H₂O no leite.

Tabela 9. Recuperação do Piretróide Cipermetrina em função do conteúdo de água no Leite em Pó.

Conteúdo de H ₂ O (gramas)	Recuperação (%)	Desvio Padrão (%)
	n = 4	
4	51,83	18,17
6	50,54	20,60
7	56,58	17,32
8	46,21	24,84
9	40,55	10,63
10	3,75	1,44

Observa-se que existe um máximo na curva (Figura 42) que corresponde a um valor de 7g de água na mistura de pó mais água. Este valor equivale a 31,18% em peso de água em relação ao conteúdo a soma da sílica-gel (15 g) e água (7 g). Podemos concluir 7g corresponde ao valor ótimo de adsorção de 15 g de sílica-gel (70 a 230 mesh). Após este valor, a recuperação cai gradativamente em função do conteúdo de água e, ao atingir 10 gramas (o que representa 40% em peso relativamente à soma sílica-gel + água) o rendimento da extração cai a 3,75% (Figura 41). Neste valor a coluna de sílica-gel atinge a saturação em termos de capacidade de adsorção, sendo este valor exatamente a porcentagem representativa da capacidade máxima de adsorção atribuída comumente à sílica-gel e, desta forma, o Piretróide não será adsorvido com eficiência sendo adsorvido em parte na gordura do leite. Isto pode ser verificado no processo de maceração da sílica com o leite fazendo-se uso de almofariz e pistilo. Verifica-se neste procedimento a formação de caroços que não são facilmente transformados em pó. Este fato leva a uma separação pobre da fase aquosa do leite em relação à gordura, a qual é necessária para que a extração do Piretróide seja bem sucedida. Em consequência, os Piretróides apolares ou pouco polares são adsorvidos preferencialmente no conteúdo de proteína do leite.

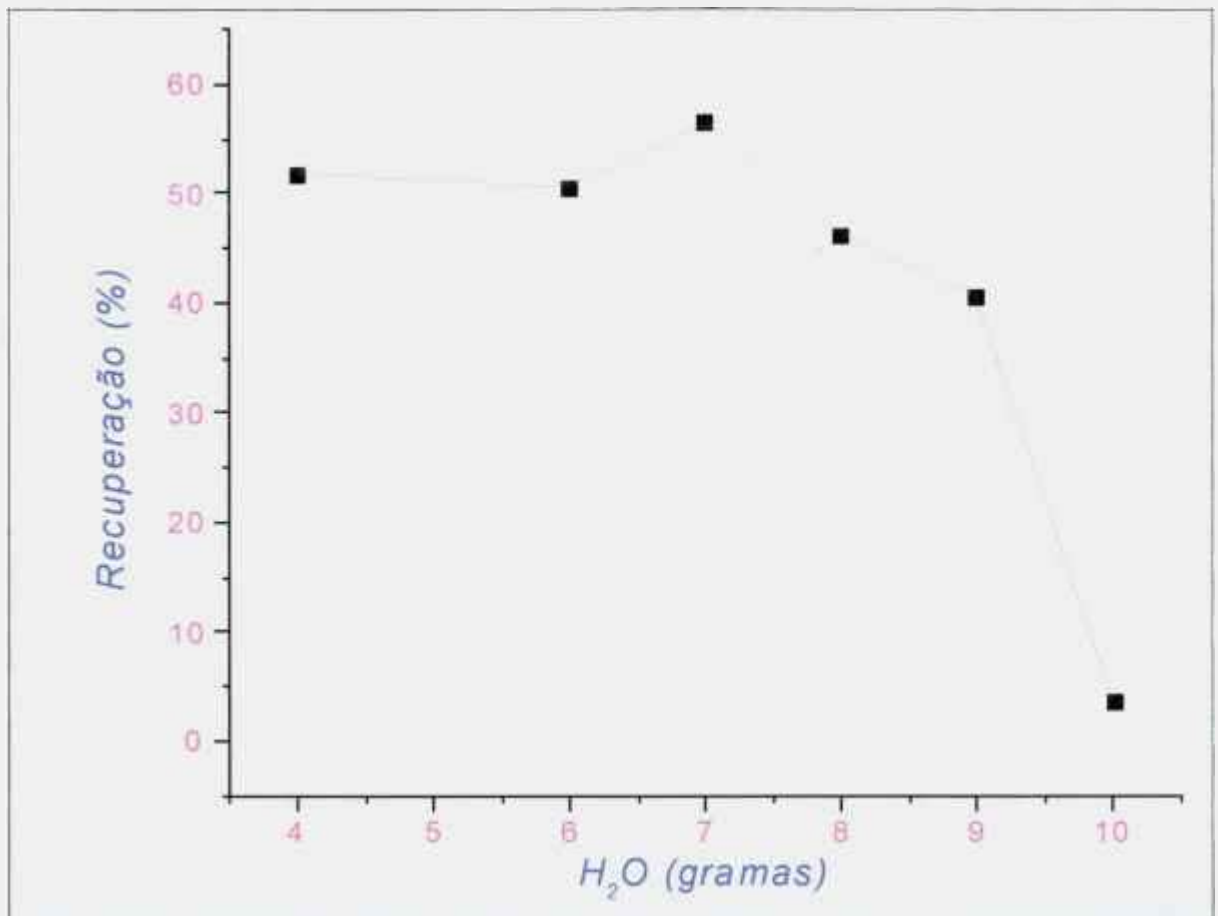


Figura 42. Variação da Recuperação na extração do Piretróide Cipermetrina (253 mg/L) em função do conteúdo de água no leite.

VI. 8. Recuperação da Cipermetrina em leite em função da concentração

Como se depreende do item anterior, as recuperações na concentração de 253 mg/L são insatisfatórias no que diz respeito ao rendimento da extração (cerca de 50%). No entanto, a diminuição da concentração da Cipermetrina leva a recuperações quantitativas. Para que isto pudesse ser verificado experimentalmente, procedeu-se à medida da recuperação em quatro concentrações, quais sejam: 253, 110, 44 e 22 mg/L. Foram utilizadas as condições experimentais correspondentes ao melhor desempenho de extração relativamente ao conteúdo de água (7 gramas), quais sejam:

Coluna de extração → 7g de H₂O + 2g de Leite em Pó +Cipermetrina
+15 g de sílica-gel desativada

Coluna de purificação (clean-up) → 13,5 g de sílica-gel + 1,5 g de H₂O

Os constituintes da coluna de extração devem ser homogenizados em almofariz até que se forme um pó fino; este procedimento leva cerca de 20 minutos. A Cipermetrina diluída em n-hexano deve ser adicionada na última etapa antes da introdução da mistura na coluna e anteriormente a homogeneização em almofariz, de modo a minimizar perdas do analito. Os constituintes da coluna de purificação devem ser homogeneizados por cerca de 15 minutos em um Becker utilizando-se um bastão de vidro. Após a extração e a purificação, que leva cerca de 2,5 horas, cerca de 160 mL do eluente (Diclorometano + N-Hexano) passa através da coluna e 40 mL do eluente é retido na mesma. Entretanto, como a maior parte do Piretróide é extraída no início da eluição, este fato não constitui nenhum inconveniente, mas sim, mostra que a cinética da extração é bastante rápida. Os 160 mL do eluente são coletados num balão de vidro que, por sua vez, é acoplado diretamente a um roto-vapor cuja temperatura de banho-maria (71 °C) é mantida ligeiramente acima do ponto de ebulição do n-hexano (68,7°C) a pressões atmosféricas com uma rotação de roto-vapor de 30 rotações por minuto. Dessa forma todo o diclorometano, que possui um ponto de ebulição de 39,8 °C, é evaporado. O procedimento é interrompido quando o volume restante no balão atinge cerca de 8 mL. O volume é introduzido num balão volumétrico de 10 mL e completado a 10 mL com n-hexano de forma a quantificar-se a concentração da Cipermetrina presente na amostra.

Para a quantificação da recuperação foram obtidas, para cada extração, quatro varreduras cromatográfica fazendo-se uso do GC/MS no modo IE-MIS selecionando-se os íons com m/z 127, 163 e 181. Da mesma forma, quatro medidas foram obtidas para padrões correspondentes a recuperações teóricas de 100%. Este procedimento foi utilizado pois foi estabelecida a linearidade da resposta do espectrômetro de massas. As respectivas áreas foram calculadas com o auxílio do programa integrador e com estes dados foram calculadas as médias de recuperação (Tabela 10).

Tabela 10. Condições experimentais e recuperações para 14 extrações de Cipermetrina em leite.

Tipo de Leite	Concetração de Cipermetrina (mg/L)	Presença de Água (g)	Presença de Leite em Pó (g)	Recuperação média (%) (n = 4)	Desvio Padrão (%)
Leite B-3	253	8,9	-----	50,29	13,67
Leite B-10	253	8,9	-----	52,57	24,24
Leite Pó 21*	253	4	6	51,83	18,17
Leite Pó 23	253	6	2	50,54	20,60
Leite Pó 24	253	7	2	56,58	17,32
Leite Pó 27*	253	7	2	44,32	10,33
Leite Pó 25	253	8	2	46,21	24,84
Leite Pó 26	253	9	2	40,55	10,63
Leite Pó 29	110	7	2	60,03	9,72
Leite Pó 31	110	7	2	66,14	5,67
Leite Pó 28	44	7	2	72,62	19,71
Leite Pó 30	44	7	2	90,79	30,51
Leite Pó 32	22	7	2	92,91	21,14
Leite Pó 33	22	7	2	94,70	31,48

* Foi utilizado o absorvedor Na_2SO_4 apenas nas amostras 21 e 27.

Considerando as mesmas condições de extração para o Leite em Pó Integral, obtivemos os dados de recuperação média listados na Tabela 11.

Tabela 11. Dados médios de recuperação na extração de Cipermetrina em leite em pó em função da concentração do analito.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperação Média (%) (n = 4)	Desvio Padrão (%)	Coefficiente de Variação (%)
22	93,80	1,25	1,33
44	81,71	12,86	15,74
110	63,08	4,33	6,86
253	50,93	5,13	10,07

A representação gráfica da recuperação *versus* concentração nos leva a ajustar o gráfico resultante (Figura 43) a uma função exponencial da forma:

$$R = R_0 + Ae^{\left(\frac{-C}{t}\right)} \quad (6.4)$$

onde R = Recuperação Média e C = Concentração da Cipermetrina são variáveis e $R_0 = 49,02 \pm 0,97$ $A = 59,75 \pm 1,26$ e $t = 74,79346 \pm 4,83797$ são constantes.

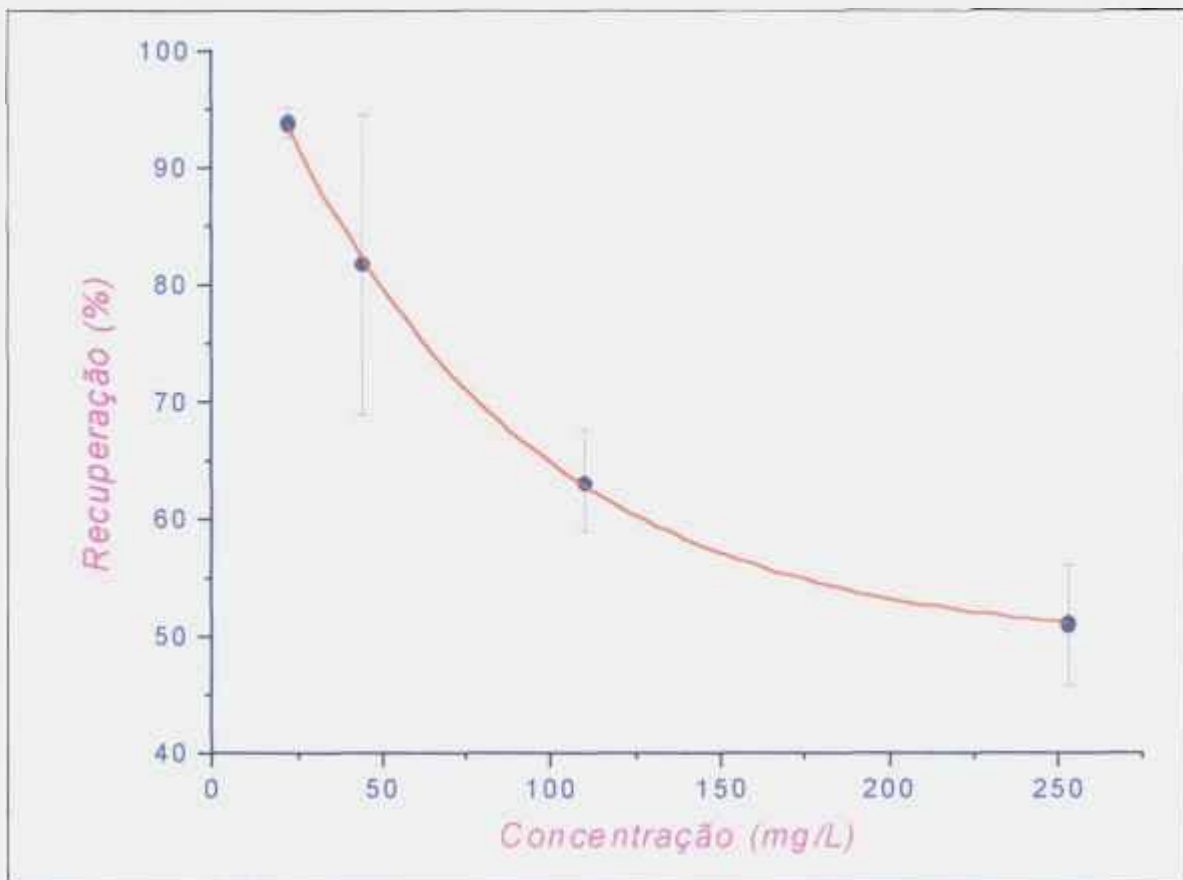


Figura 43. Variação da recuperação na extração do piretróide Cipermetrina em função da concentração.

A interpolação observada na Figura 43 fornece um valor do coeficiente de correlação de 0,99961, o que mostra que os dados experimentais estão perfeitamente ajustados a uma equação do tipo exponencial. A queda exponencial pode ser explicada pelo alargamento do pico cromatográfico na medida em que se aumenta a concentração do Piretróide. Este alargamento provoca uma má separação cromatográfica do Piretróide relativamente a outros compostos coeluentes e, em função da sobreposição do analito relativamente a estes compostos da matriz coeluyente presente no leite, parte do analito fica retida na coluna.

VI. 9. Limites de detecção e quantificação do Piretróide Cipermetrina: Comparação dos modos de aquisição AIS, MIS e AMIS.

Os modos de Armazenamento de Íons Seleccionados (AIS) e Monitoração de Íons Seleccionados (MIS), embora possam ser facilmente confundidos, dizem respeito a procedimentos completamente distintos no sistema do espectrômetro de massa de armadilha iônica. No modo AIS, íons escolhidos previamente são isolados no interior da armadilha iônica através do campo quadrupolar tridimensional. Isto é realizado ejetando-se todos os outros íons não pertencentes ao conjunto de íons escolhidos para armazenamento através da aplicação de uma forma de onda não senoidal contendo um espectro de frequências [51]. Neste método, as espécies iônicas são ejetadas simultaneamente. Formas de onda são criadas por métodos numéricos. Estas formas de onda digitais são então convertidas em sinais analógicos através de um conversor digital / analógico de alta velocidade (DAC). Na realidade uma forma de onda de multifrequência é imposta de tal forma a se excluir as frequências correspondentes aos íons a serem isolados. A amplitude de tensão auxiliar (V_{aux}), utilizada para a ejeção dos íons, é variada de forma a se maximizar a corrente de íons das espécies não ejetadas e ejetar o restante dos íons. Entretanto, a ejeção de uma única massa isolada só é possível para valores pequenos (Figura 44) pois existe uma dependência não linear entre o valor m/z da espécie isolada e a janela de massa realmente isolada.

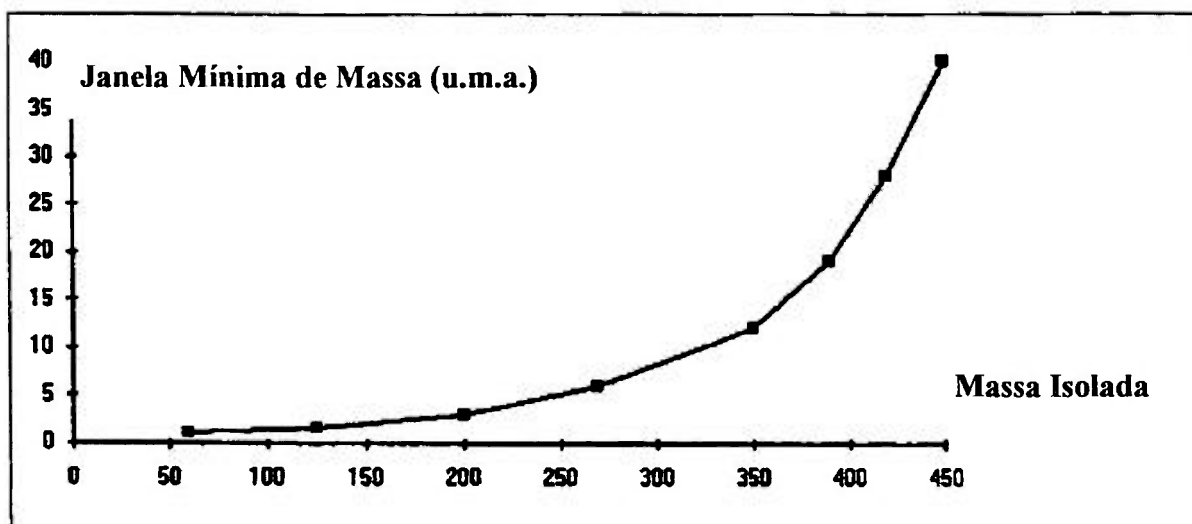


Figura 44. Massa especificada para isolamento em função da janela mínima de massa realmente isolada.

Observa-se pelo gráfico da Figura 44 que quanto maior a massa especificada para isolamento, maior o intervalo de massa que de fato é isolado. Por exemplo, se especificarmos o íon 100^+ para armazenamento, na realidade serão isolados os íons que variam de 98^+ a 102^+ ou se especificarmos o íon 224^+ , serão isolados os íons que variam entre 220^+ e 228^+ . Por outro lado, o modo MIS se constitui num recurso computacional através do qual escolhem-se até três íons ou um intervalo de íons escolhidos de um cromatograma já obtido anteriormente. Portanto esta técnica diz respeito apenas a um tratamento de dados realizado a *posteriori* e não a um isolamento físico de íons na armadilha iônica.

Com o objetivo de comparar as duas técnicas e, inclusive utiliza-las simultaneamente, e verificarem-se os limites de detecção e quantificação para o composto Cipermetrina, procedemos à obtenção de dados, onde foram obtidos os espectros de Varredura Iônica Total (VIT), MIS, com AIS e AIS e AMIS (modos AIS e MIS combinados) onde, no modo AIS, foram especificados para armazenamento os íons com m/z 91, 127, 152, 163 e 181, que se constituem nos íons mais intensos do espectro de massa da Cipermetrina, e no modo MIS foram selecionados os íons com m/z 127, 163 e 181. Para este fim, foram computados os valores sinal / ruído para os picos A e B do cromatograma referentes aos dois primeiros isômeros da Cipermetrina utilizando padrões (93%) nas concentrações 4,4; 2,2; 1,1; 0,22; 0,10; 0,066 e 0,033 mg/L. Estes dados estão listados na Tabela 12.

Tabela 12. Relações sinal/ruído para dois isômeros da Cipermetrina nos modos de aquisição VIT, MIS, AIS e AMIS.

Modo	Concent.(µg/ml)	Sinal/Ruído- A	Sinal/Ruído-B
VIT	4,4	3,3	Não detectado
MIS	4,4	10,6	7,6
AIS	4,4	13,5	18,0
AMIS	4,4	19,2	20,3
VIT	2,2	2,7	Não detectado
MIS	2,2	7,1	6,2
AIS	2,2	13,3	18,3
AMIS	2,2	21,6	14,3
VIT	1,1	3,7	Não detectado
MIS	1,1	15,4	9,1
AIS	1,1	8,2	13,5
AMIS	1,1	8,6	11,3
VIT	0,220	Não detectado	Não detectado
MIS	0,220	3,2	3,8
AIS	0,220	7,1	10,9
AMIS	0,220	7,7	15,9
VIT	0,100	Não detectado	Não detectado
MIS	0,100	“	“
AIS	0,100	6,1	5,9
AMIS	0,100	6,6	7,2
VIT	0,066	Não detectado	Não detectado
MIS	0,066	“	“
AIS	0,066	7,6	7,9
AMIS	0,066	7,0	7,2
VIT	0,033	Não detectado	Não detectado
MIS	0,033	“	“
AIS	0,033	“	“
AMIS	0,033	3,7	2,6

Observa-se nas figuras 45 e 46 e pelos dados da Tabela 12 que a utilização dos recursos MIS e AIS provoca um aumento substancial das relações sinal/ruído relativamente ao modo VIT.

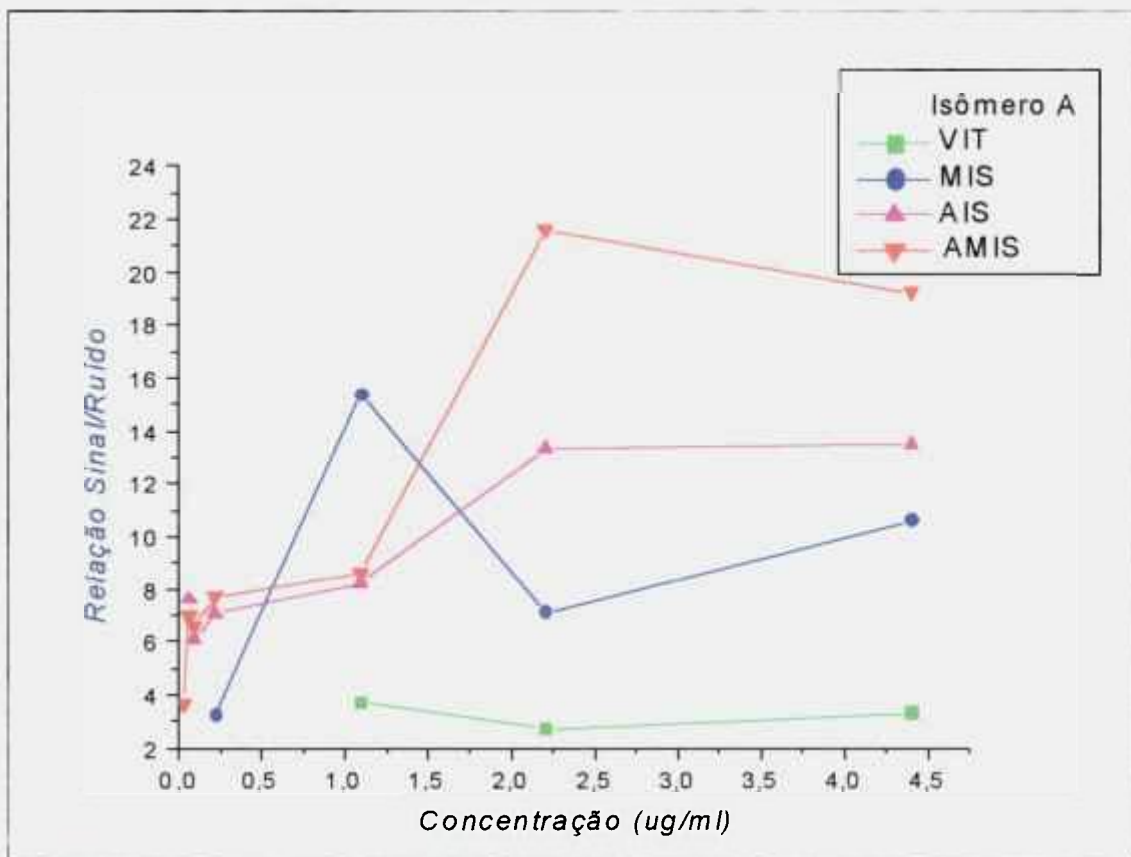


Figura 45. Variação da relação sinal/ruído em função da concentração da Cipermetrina nos vários modos de aquisição de dados no espectrômetro de massa para o isômero A.

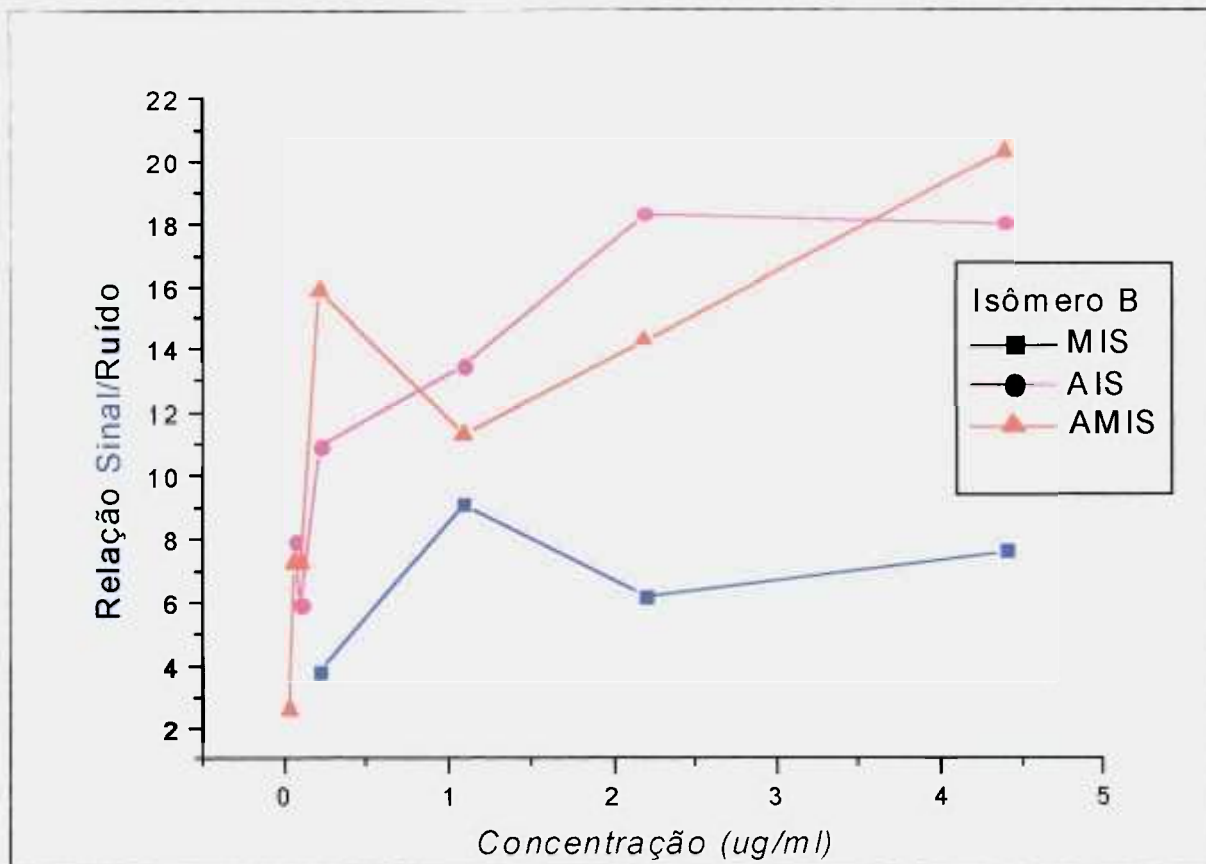


Figura 46. Variação da relação sinal/ruído em função da concentração da Cipermetrina nos vários modos de aquisição de dados do espectrômetro de massa para o Isômero B.

Para o isômero A, abaixo de $0,1 \mu\text{g/mL}$, só é possível detectar-se o analito fazendo-se uso do modo AIS. Isto mostra que a ejeção física dos íons na armadilha iônica leva a níveis de detecção menores do que a utilização apenas do recurso computacional MIS. Isto é explicado pelo fato de que a ejeção de grande parte da matriz iônica diminui consideravelmente efeitos de carga espacial no interior da armadilha iônica pois a interação destas com os íons do analito leva a perdas das moléculas de interesse que em parte são arremessadas para fora da ação do potencial aprisionador e em direção às paredes hiperbólicas da armadilha iônica, desta forma, atingem-se limites de detecção menores do que fazendo uso apenas da técnica MIS. Como no modo AIS a especificação de um único íon leva ao isolamento de uma janela de íons, ocorre que é possível remediar este efeito utilizando simultaneamente os modos AIS e MIS como pode ser visto na figura 47 onde os íons com m/z 126, 151, 161, 162, 179 e 180 são eliminados da varredura. Também os íons m/z 91 e 152 são eliminados pois só é possível, com o software disponível, eliminarem-se 3 íons simultaneamente, a menos que se escolha um intervalo de íons e portanto este fato se constitui numa limitação da técnica.

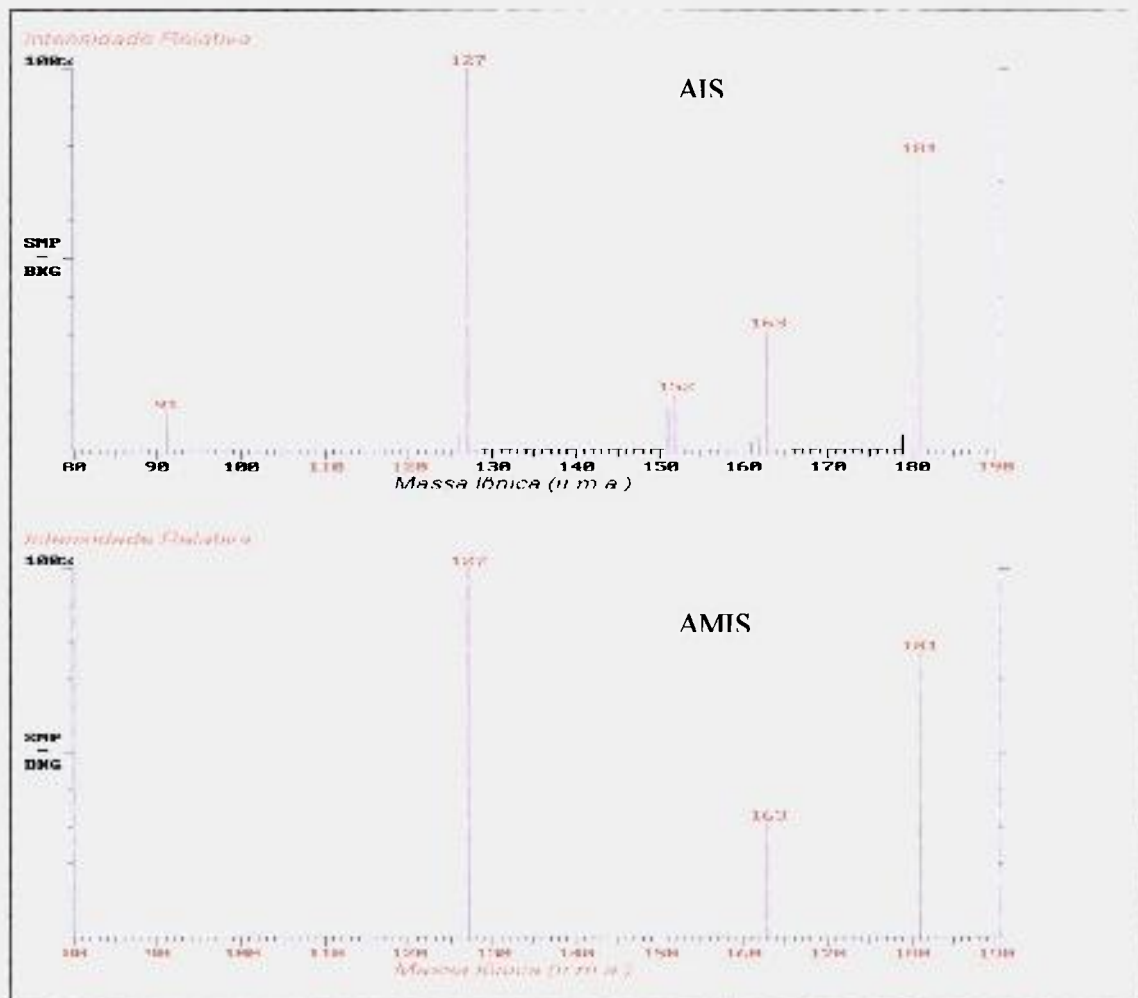


Figura 47. Espectros de Massa no modo AIS e AMIS do Piretróide Cipermetrina obtido por ionização com impacto de elétrons.

Para o isômero A do Piretróide Cipermetrina, o limite de determinação de 0,033 $\mu\text{g/mL}$ só é atingido com a utilização do modo AMIS. Com base nestes dados o limite de quantificação pode ser estimado como 0,330 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, se a amostra for concentrada a um décimo do volume inicial do solvente, o limite de quantificação cai a 0,033 $\mu\text{g/mL}$. Verifica-se que a partir de 4,4 $\mu\text{g/mL}$ não é possível detectar-se o isômero B utilizando-se o modo total. Mais uma vez, o limite de determinação só é atingido com a utilização do modo AMIS. Em termos gerais as relações sinal/ruído são amplamente superiores quando da utilização do modo AIS ou do modo de AMIS relativamente aos espectros VIT e MIS.

VI. 10. Determinação de Cipermetrina em leite bovino

Nesta etapa procuramos determinar Piretróides em leite bovino após aplicação via dérmica do inseticida ALATOX que é utilizado no combate a berne (larvas da *Dermatobia hominis*), moscas-do-chifre, carrapatos e piolhos. O inseticida em questão é um concentrado emulsionável, contendo 450 g/L de Diclorvos (Dimetil-2,2-diclorovinil fosfato) e 50 g/L de Cipermetrina (Alfa-ciano 3-fenoxibenzila -2,2-dimetil-3-(2,2 diclorovinil) ciclopropano carboxilato). Foi utilizado, em conformidade às instruções de uso, 10 mL do referido inseticida diluído em 4 litros de água, perfazendo uma concentração inicial de 125 mg/L para a Cipermetrina. Os 4 litros do inseticida contendo 0,5 g de Cipermetrina, foram pulverizados sobre o corpo do animal, sobretudo nas partes mais intensamente infestadas tais como barbelas, axilas, ventre, virilhas, entre-membros e inserção de cauda. Após a coleta das amostras de leite, procedemos às extrações e purificações, com os resíduos resultantes sendo concentrados a 10 mL de n-hexano. Na obtenção de cada cromatograma, 1 µL de cada extrato foi injetado no GC/MS e obtiveram-se 4 cromatogramas para cada extrato, referentes às extrações de amostras de leite coletadas em 15 horas, 24 horas, 11 dias e 17 dias após a aplicação do ALATOX. Os principais compostos obtidos na extração e provenientes do ALATOX estão listados nas Tabelas 13, 14 e 15, referentes aos períodos de extração 15 h, 24 h e 11 dias respectivamente. O experimento descrito acima foi realizado numa fazenda de criação de gado leiteiro, localizada no município de Piratininga-SP.

Tabela 13. Principais compostos extraídos do leite coletado após 15 horas da aplicação e originados do inseticida ALATOX.

Tempo de retenção (min.)	Composto	Massa (u.m.a.)	Fórmula Molecular	Intensidade iônica média (Área) n = 4	Modo de aquisição
5,84	Diclorvos	220	C ₄ H ₇ Cl ₂ PO ₄	4023	Total
7,53	Butilato de Hidroxitolueno	220	C ₁₅ H ₂₄ O	123210	Total
24,89	Cipermetrina	416	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	12999	AIS

Tabela 14. Principais compostos extraídos do leite coletado após 24 horas da aplicação e originados do inseticida ALATOX.

Tempo de retenção (min.)	Composto	Massa (u.m.a.)	Fórmula Molecular	Intensidade iônica média (Área) n = 4	Modo de aquisição
5,84	Diclorvos	220	C ₄ H ₇ Cl ₂ PO ₄	4205	Total
7,53	Butilato de Hidroxitolueno	220	C ₁₅ H ₂₄ O	227354	Total
24,89	Cipermetrina	416	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	13177	AIS

Tabela 15. Principais compostos extraídos do leite coletado após 11 dias da aplicação e originados do inseticida ALATOX.

Tempo de retenção (min.)	Composto	Massa (u.m.a.)	Fórmula Molecular	Intensidade iônica média (Área) n = 4	Modo de aquisição
5,84	Diclorvos	220	C ₄ H ₇ Cl ₂ PO ₄	-----	Total
7,53	Butilato de Hidroxitolueno	220	C ₁₅ H ₂₄ O	20003	Total
24,89	Cipermetrina	416	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	6149	AIS

Nestas tabelas observa-se a presença dos compostos Diclorvos e do Butilato de Hidroxitolueno originalmente contidos na composição do inseticida ALATOX. O Diclorvos se constitui num inseticida organofosforado presente na formulação do ALATOX e co-extraído com o Piretróide alvo (Cipermetrina). O Butilato de Hidroxitolueno, não especificado pelo fabricante, se constitui num composto químico de propriedades conservantes, também presente no inseticida e co-extraído com a Cipermetrina. Após o 11º dia, o inseticida Diclorvos não é detectado pelo GC/MS e o composto Butilato de Hidroxitolueno tem a sua intensidade diminuída de um fator onze aproximadamente, em relação à amostra colhida depois de 24 horas.

As intensidades iônicas obtidas para a Cipermetrina foram adquiridas no modo AIS no qual foram selecionados os íons com m/z 127, 152 e 181 (Cipermetrina). A intensidade iônica obtida corresponde à média de 4 picos cromatográficos. Foi escolhido o isômero B da Cipermetrina para a correspondente quantificação em função da inexistência de picos interferentes eluindo com o mesmo tempo de retenção, contrariamente ao que acontece com o isômero A (Figura 48). O íon com m/z 163, em que pese ser o íon mais intenso da Cipermetrina, não foi escolhido pois existe um coelúente que produz o mesmo íon e portanto poderia haver uma sobreposição de intensidades levando a uma quantificação errônea do analito. O modo AIS foi utilizado pois o cromatograma total, mesmo com a utilização do recurso MIS produz picos com relações sinal/ruído menores que 10 e portanto os mesmos estão fora do limite de quantificação. Os compostos Diclorvos e Butilato de Hidroxitolueno foram concentrados a 10 mL e suas respectivas áreas foram calculadas com base nesta concentração, enquanto a quantificação da Cipermetrina só foi possível graças a uma concentração do analito a 1 mL o que nos forneceu relações sinal/ruído compatíveis com os níveis de quantificação desejados. O isômero B foi escolhido para a quantificação pois o isômero A possui co-elúentes que interferem excessivamente na análise na medida que as concentrações do analito a ser determinado são extremamente baixas. Além disso o pico B constitui-se no isômero mais intenso do cromatograma.

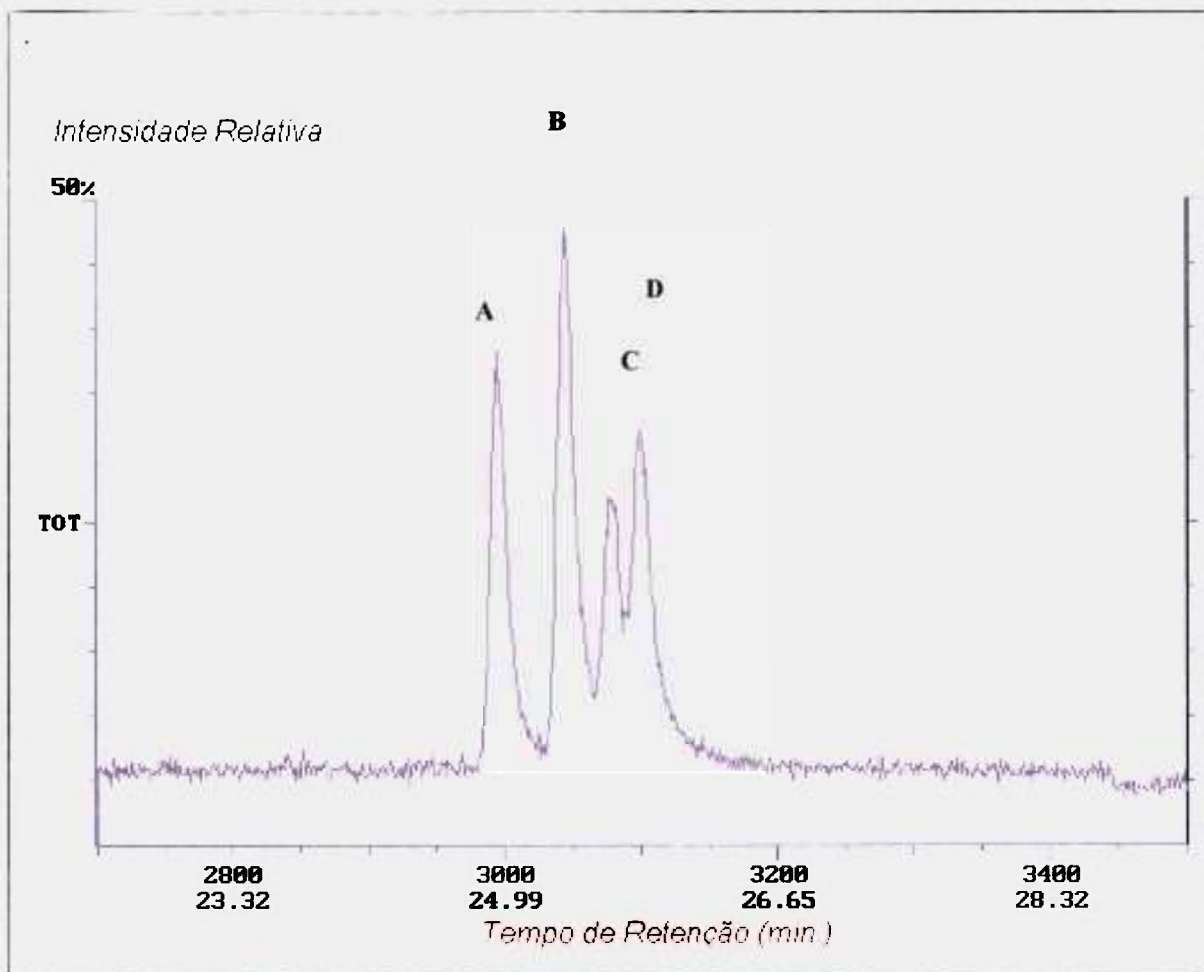


Figura 48 . Cromatograma do Piretróide Cipermetrina originado da extração de leite bovino coletado após 15 horas da aplicação veterinária do inseticida ALATOX. O cromatograma foi obtido no modo AIS, onde foram selecionados os íons com m/z 127, 152 e 181.

As concentrações de Cipermetrina no leite foram obtidas com a utilização de uma curva de calibração externa construída com os padrões do referido composto em concentrações que variaram entre 0,4 e 4,4 mg/L. Cada concentração individual foi obtida em triplicata sendo, os dados obtidos, ajustados através de uma reta com a utilização do método dos mínimos quadrados (Figura 49).

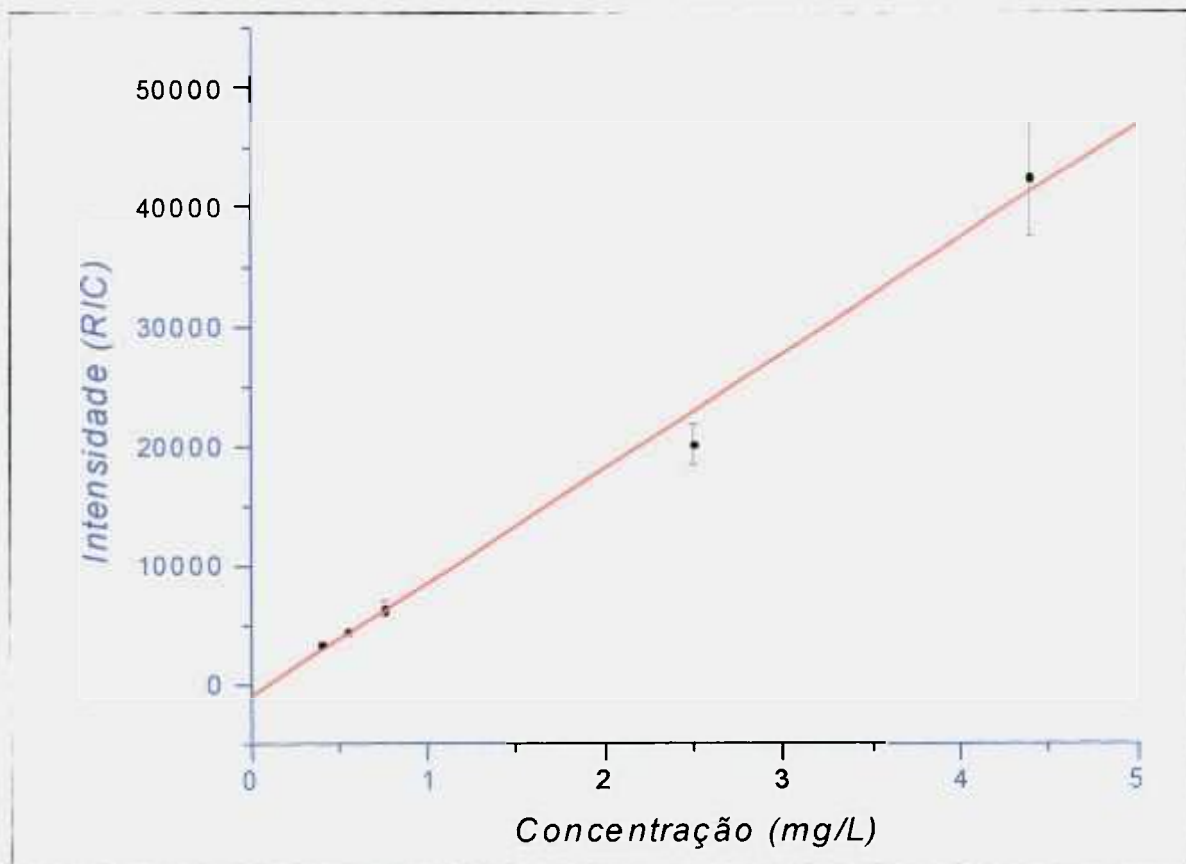


Figura 49. Curva de calibração do Piretróide Cipermetrina no modo AIS.

O coeficiente de correlação obtido é de 0,948 e a reta de regressão tem a seguinte equação:

$$RIC = 652,12 + (7475,34)C \quad (6.5)$$

onde *RIC* é a corrente iônica relativa e *C* é concentração da Cipermetrina.

Tomando-se como base a equação de regressão 5.5, podemos calcular as concentrações de Cipermetrina para as amostras coletadas após 15, 24 horas e 11 dias da aplicação do ALATOX (Tabela 16).

Tabela 16. Concentrações obtidas após extração de Cipermetrina em leite. As amostras foram concentradas a 1 ml no solvente.

Tempo de Coleta	Média das Áreas (Contagens)	Concentração média (mg/L) n=4	Desvio Padrão (mg/L)
15 horas	12999	1,65	± 0,08
24 horas	13178	1,68	± 0,36
11 dias	6149	0,74	± 0,09
17 dias	Não detectado	-----	-----

No entanto, a Tabela 16 fornece as concentrações a 1 mL do solvente. Dessa forma os dados acima devem ser divididos por 10 para que se mantenha a relação → 10 gramas de leite → 10 mL de n-hexano, utilizada para fins de quantificação. Portanto a concentração real do analito no leite será dada pelos valores mostrados na Tabela 17.

Tabela 17. Concentração de Cipermetrina por kg de leite para quatro tempos distintos de coleta: 15 horas, 24 horas, 11 dias e 17 dias.

Tempo de Coleta	Concentração (mg/kg)	Desvio Padrão (mg/kg) n = 4	Coefficiente de Variação (%)
15 horas	0,165	± 0,008	4,85
24 horas	0,168	± 0,036	21,43
11 dias	0,074	± 0,009	12,16
17 dias	Não detectado	-----	-----

Conhecendo-se a concentração inicial aplicada (125 mg/L) e medindo-se as áreas correspondentes à Cipermetrina nos cromatogramas obtidos é possível avaliar-se a porcentagem do Piretróide secretada no leite após a aplicação dérmica. A quantidade secretada relativamente à quantidade aplicada foi de 0,0066%, 0,0013% e 0,00045% respectivamente para 15h e 24h e 11 dias. Dados fornecidos pela WHO dão conta de que o piretróide Cipermetrina, quando aplicado dermicamente na forma de spray ou banho, no combate a parasitas, originou um valor máximo de resíduos de 0,01 mg/L [72]. Obviamente estes dados contrariam este estudo e o realizado no CEATOX (UNESP-Botucatu) pelos pesquisadores Vassilieff e Bissacot que constataram a presença de 0,36; 0,15; 0,14; 0,11 e 0,06 mg/kg de Cipermetrina em leite bovino respectivamente nos dias 1º, 7º, 14º, 21º, 28º após a aplicação de 0,35 gramas do inseticida por animal. Em parte, esta incongruência pode ser justificada em função da relativa antiguidade dos dados fornecidos pela WHO cujas referências datam dos anos 70 e início dos anos 80, e pela escassez de estudos recentes sobre o tema. Por outro lado, após os anos 80, houve uma grande evolução no que concerne aos métodos de extração e purificação, bem como das técnicas

analíticas utilizadas, sobretudo quanto à sensibilidade, fato este que permitiu níveis de quantificação menores.

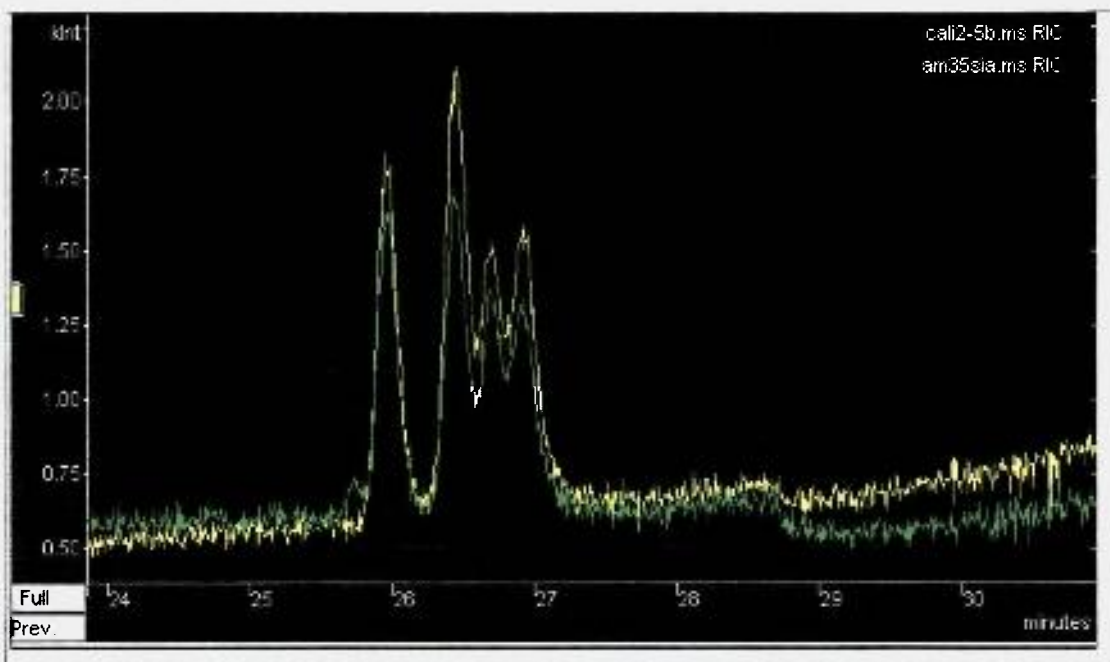


Figura 50. Sobreposição dos cromatogramas do Piretróide Cipermetrina originados do extrato coletado em 24 horas após a aplicação (1,68 mg/L) e do padrão concentrado a 2,5 mg/L no modo AIS. O cromatograma amarelo corresponde ao padrão e o verde corresponde ao extrato.

Como se observa na Figura 50, onde estão sobrepostos um cromatograma do padrão de Cipermetrina 2,5 mg/L e um cromatograma do extrato obtido de uma amostra coletada após 24 horas (1,68 mg/L), existe uma clara concordância no que diz respeito aos tempos de retenção e resolução dos isômeros do inseticida Cipermetrina. Os espectros foram obtidos no modo AIS no qual foram selecionados em ambos os íons com m/z 127, 152 e 183 como representativos do espectro de massa no modo de ionização por impacto de elétrons do analito estudado. Portanto, em função dos dados acima expostos, a identidade do composto analisado é conclusiva, corroborando desta forma os estudos previamente realizados [26, 27].

VI. 11. Limites máximos de resíduos

No Brasil os limites de tolerância, limites máximos de resíduos (LMRs), são competência do Ministério da Saúde. No entanto, em função da inexistência de legislação pertinente a resíduos de Piretróides em leite bovino, utilizam-se normas do Codex

Alimentarius, FDA (Food and Drugs Administration-EUA) ou Diretivas da União Européia.

De maneira geral, os níveis de resíduos de pesticidas permissíveis em alimentos variam de 0,05 a 2 mg/Kg. Alguns destes limites máximos de resíduos são mostrados na Tabela 18 , sendo os dados fornecidos pela Codex Alimentarius Commission (EUA).

Tabela 18. Resíduos máximos permissíveis em alguns alimentos, segundo dados do Codex Alimentarius.

Colheita	Limite máximo de resíduos (mg/kg)
Cítricos	2
Alface	2
Grãos oleosos (exceto amendoim)	0,2
Ervilhas	0,05
Tubérculos e Raízes	0,05
Tomate	0,5
Grãos de Trigo	0,2

Mais especificamente, os resíduos de Cipermetrina podem também ser encontrados em alimentos de origem animal (leite, produtos lácteos, ovos e carnes) através de aplicações tópicas em criações, visando o controle de ectoparasitas ou através da presença de resíduos em rações. Nos EUA, os resíduos reais em carne e leite são esperados serem presumivelmente menores que os níveis de tolerância de 0,05 mg/Kg por litro produzido (Tabela 19) [72].

Tabela 19. Resíduos máximos permissíveis para Cipermetrina em alimentos de origem animal.

Mercadoria	Limite Máximo Residual (mg/kg)
Carne	0,2
Ovos	0,05
Leite	0,01

Considerando o LMR de 0,01 mg/kg para o leite, verificamos que os dados obtidos são cerca de 16 vezes superiores a este limite nas amostras coletadas em 15 e 24 horas após a aplicação do inseticida e cerca de 7 vezes superior para a amostra coletada após 11 dias da aplicação.

Os dados apresentados na Tabela 19 mostram que a ingestão do leite coletado até o 11º dia da coleta, após a aplicação do inseticida, levará a contaminação de quaisquer indivíduos que venham a consumir este alimento. Apesar da assinalada baixa concentração, o consumo constante do leite, sobretudo no meio rural, no qual o leite não sofre qualquer intervenção industrial, pode levar a anomalias no sistema nervoso ou outras alterações fisiológicas que não foram suficientemente compreendidas ou estudadas.

Cabe assinalar a presença do organofosforado Diclorvos (Tabelas 14 e 15). As exposições crônicas a baixos níveis de Diclorvos e outros compostos organofosforados têm sido reportadas em alguns estudos como associadas à insônia, irritabilidade, dores de cabeça e tonturas. O Diclorvos afeta primariamente o sistema nervoso, através da inibição da colinesterase, o bloqueador da enzima requerida para o funcionamento apropriado das células nervosas [73]. Notemos que a não detecção do Diclorvos a partir do 11º dia indica sua rápida metabolização no organismo do animal submetido ao tratamento veterinário.

VII. CONCLUSÕES

Com base no estudo teórico e experimental realizado e nos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

1 - As duas técnicas de ionização utilizadas (Ionização Química e Impacto por Elétrons) são viáveis na análise de Piretróides via GC/MS. Em ambas técnicas de ionização observa-se preferencialmente a clivagem da ligação éster. Na ionização química existe uma possibilidade maior de se observar o pico molecular. No entanto, no caso dos inseticidas Permetrina e Cipermetrina houve grande fragmentação do pico molecular, fato este que denota a grande diferença de protoafinidade entre os principais íons reagentes ($\text{CH}_5^+ = 131,6 \text{ kcal/mol}$ e $\text{C}_2\text{H}_5^+ = 162,6 \text{ kcal/mol}$) e as moléculas de interesse na qual a diferença de entalpia se dissipa como energia de fragmentação. Cabe salientar que na medida em que exista a disponibilidade de uso de gases reagentes com protoafinidades maiores que a do gás metano (amônia, isobutano, etc.), a diferença de protoafinidade entre a molécula de interesse e o gás reagente diminui, aumentando-se a probabilidade de se observar o íon molecular em função da diminuição da fragmentação molecular.

2 - A temperatura de injeção da amostra que deve ser maior que o ponto de ebulição da molécula de interesse de tal forma a se garantir que toda a amostra seja vaporizada no momento da introdução da mesma no GC/MS. No entanto, a temperatura inicial da coluna cromatográfica deve estar pelo menos 20°C abaixo da temperatura de ebulição do solvente de tal forma que ocorra uma separação eficiente entre o solvente e o soluto (amostra).

3 - Constatou-se que o solvente mais adequado para diluição e análise de Piretróides é o n-hexano, o qual proporciona uma relação sinal/ruído mais favorável que outros solventes.

4 - A clivagem preferencial da ligação éster, observada nos espectros de massa, está diretamente relacionada com a fácil metabolização dos Piretróides em mamíferos em função da baixa energia requerida para que a mesma ocorra, tanto no interior do Ion-Trap,

com os íons na fase gasosa, quanto no processo de metabolização destes compostos inseticidas em mamíferos, nos quais ocorre clivagem eletrolítica da ligação éster seguida por oxidação.

5 - O modo AIS é uma ferramenta necessária na detecção e quantificação de Piretróides via GC/MS, pois aumenta as relações sinal/ruído, acarretando em um aumento de sensibilidade e diminuição do limite de determinação e quantificação do método.

6 - O método de extração com dispersão em matriz sólida seguido de purificação via coluna cromatográfica preenchida com sílica-gel, é bastante satisfatório no que diz respeito à recuperação de Piretróides acrescentados ao leite bovino. Foram atingidos níveis de recuperação maiores que 90%.

7 - Existe uma dependência entre o conteúdo de água na amostra e o nível de recuperação da extração. Na coluna de extração, para o leite em pó, o nível de recuperação máximo ocorre com um conteúdo aquoso de 31,18% em peso de H₂O em relação ao conteúdo a soma da sílica-gel (15 g) e água (7 g).

8 - A Recuperação do Piretróide Cipermetrina cai exponencialmente em função do aumento da concentração de Cipermetrina no leite.

9 - O limite mínimo de detecção (L.M.D.) para o analito só é atingido com a utilização dos recursos AIS e MIS. Para a Cipermetrina foi obtido um L.M.D. de 33 µg/mL numa amostra concentrada a 10 mL de n-hexano.

10 - As concentrações do Piretróide Cipermetrina, obtidas em leite bovino, após a aplicação do inseticida ALATOX, nas amostra coletadas 15 horas, 24 horas, 11 dias depois da aplicação, foram respectivamente 0,165; 0,168 e 0,074 mg/kg. No 17º dia após a aplicação o piretróide Cipermetrina não foi detectado.

11 - Além do inseticida Cipermetrina, foram detectados o organofosforado Diclorvos e o composto conservante Butilato de Hidroxitolueno. Estes compostos também provêm do inseticida ALATOX.

12 - Os dados obtidos mostram que a concentração do Piretróide Cipermetrina é cerca de 16 vezes superior ao limite máximo residual (LMR = 0,01 mg/kg) nas amostras coletadas em 15 e 24 horas após a aplicação do inseticida e cerca de 7 vezes superior para a amostra coletada após 11 dias da aplicação.

13 - Com as amostras concentradas a 1 mL do solvente, pode-se atingir níveis de detecção de 0,0033 mg/kg e portanto é possível detectarem-se concentrações da ordem 0,01 mg/kg, que se constitui no LMR para o leite bovino.

APÊNDICE

Cálculo das soluções da equação de Mathieu para $\beta = 1$.

Nosso objetivo neste apêndice é calcular soluções para a equação de Mathieu para um caso particular. Esta equação diferencial linear de segunda ordem, com coeficientes periódicos, tem grande aplicabilidade em problemas físicos variados tais como o pêndulo invertido, oscilações forçadas num circuito LC, movimento de membranas vibrantes etc.

Quando os coeficientes de uma equação diferencial têm um único valor, são contínuos e periódicos, digamos com período π , a solução não necessariamente possui também período π . De fato pode não admitir (e em geral não admite) soluções periódicas [74].

Então a equação

$$dy/dx + (a + q\cos 2x)y = 0 \quad (\text{A.1})$$

não tem solução periódica a menos que $a = 0$

Por exemplo, verifiquemos a solução da equação abaixo:

$$d^2y/dx^2 + ny = 0 \quad (\text{A.2})$$

se

$$y = e^{inx} \quad (\text{A.3})$$

obtemos

$$dy/dx = in e^{inx} \quad (\text{A.4})$$

e ainda

$$d^2y/dx^2 = i^2 n^2 e^{inx} = -n^2 e^{inx} \quad (\text{A.5})$$

substituindo (A.3) e (A.5) em (A.2) temos:

$$-n^2 e^{inx} + n^2 e^{-inx} = 0 \quad (\text{A.6})$$

Observa-se que temos associada a soluções periódicas, funções exponenciais complexas cujo período não será π a menos que n seja inteiro.

Consideremos agora a equação de Mathieu,

$$d^2u/d\xi^2 + (a - 2q \cdot \cos 2\xi)u = 0 \quad (\text{A.7})$$

lembrando que no caso da armadilha iônica $\xi = \Omega t/2$

onde $\Omega =$ frequência angular da RF aplicada ($\Omega = 2\pi f$).

O teorema de Floquet [75] afirma que a solução geral da equação (A.6) tem a forma:

$$u = A \cdot u(\xi) + B \cdot u(-\xi) \quad (\text{A.8})$$

onde

$$u(\xi) = e^{\mu\xi} \cdot \psi(\xi) \quad (\text{A.9})$$

ou seja

$$u(\xi) = A \cdot \psi(\xi) \cdot e^{\mu\xi} + B \cdot \psi(-\xi) \cdot e^{-\mu\xi} \quad (\text{A.10})$$

onde $u(\xi)$ é a soma de soluções ímpares e pares. A e B são constantes arbitrárias e $\psi(\xi)$ é uma função periódica de ξ .

O coeficiente μ pode ser expresso como:

$$\mu = \alpha + i\beta \quad (\text{A.11})$$

se α for diferente de zero, os termos $e^{\mu\xi}$ ou $e^{-\mu\xi}$ na equação (A.10) tenderão ao infinito conforme ξ aumenta e portanto as soluções serão instáveis.

Portanto as soluções da equação devem ser necessariamente imaginárias. Explicitamente temos que,

$$u(\xi) = e^{\mu\xi} \cdot \psi(\xi) \quad (\text{A.12})$$

$$u(\xi) = e^{\alpha + i\beta} \cdot \psi(\xi) \quad (\text{A.13})$$

Pelo teorema de Fourier, uma função periódica, tal como $\psi(\xi)$, pode ser expressa como uma soma infinita de termos exponenciais da forma:

$$u(\xi) = e^{\alpha + i\beta} \cdot \sum_{-\infty}^{+\infty} c_n e^{i(2n + \beta)\xi} \quad (\text{A.14})$$

onde n na somatória varia de $-\infty$ a $+\infty$.

Utilizando a identidade

$$e^{i\theta} = \cos\theta + i \cdot \text{sen}\theta \quad (\text{A.15})$$

teremos

$$u(\xi) = D \cdot \sum_{-\infty}^{+\infty} c_n \cos(2n + \beta)\xi + E \cdot \sum_{-\infty}^{+\infty} c_n \text{sen}(2n + \beta)\xi \quad (\text{A.16})$$

onde D e $E = E \cdot i$ são constantes arbitrárias

Considerando a velocidade inicial do íon nula [76], a equação (A.16) se reduz ao termo em coseno. Além disso, consideremos que a somatória em n varie de 0 a ∞ , e que β e D sejam iguais a unidade, ou seja:

$$u(\xi) = \sum_0^{+\infty} c_n \cos(2n + 1)\xi \quad (\text{A.17})$$

Vamos substituir esta série na equação (A.7) e igualar os termos de mesmo coeficiente com o intuito de obter relações de recorrência que conectem os termos c_n , a e q . Inicialmente para $n = 1$ temos:

$$c_1(\xi) = c_0 \cos\xi + c_1 \cos 3\xi \quad (\text{A.18})$$

tomando a segunda derivada dos $c_n(\xi)$ para $n = 1$ temos:

$$c_n'' = - \sum_n^{+\infty} c_n (2n - 1)^2 \cos(2n + 1)\xi \quad (\text{A.19})$$

$p/n = 1$ temos

$$c''_1 = -(c_0 \cos \xi + c_1 9 \cos 3 \xi) \quad (\text{A.20})$$

substituindo (A.18) e (A.20) na equação de Mathieu,

$$d^2 u / d \xi^2 + (a - 2q \cos 2 \xi) u = 0 \quad \text{temos}$$

$$-c_0 \cos \xi - c_1 9 \cos 3 \xi + (a - 2q \cos 2 \xi)(c_0 \cos \xi + c_1 \cos 3 \xi) = 0 \quad (\text{A.21})$$

$$-c_0 \cos \xi - c_1 9 \cos 3 \xi + c_0 a \cos \xi + c_1 a \cos 3 \xi - c_0 2q \cos \xi \cos 2 \xi - c_1 2q \cos 2 \xi \cos 3 \xi = 0 \quad (\text{A.22})$$

mas podemos fazer as seguintes substituições trigonométricas:

$$2 \cos 3 \xi \cos 2 \xi = \cos \xi + \cos 5 \xi \quad (\text{A.23})$$

$$2 \cos 2 \xi \cos \xi = \cos \xi + \cos 3 \xi \quad (\text{A.24})$$

substituindo (A.23) e (A.24) em (A.20) obtemos:

$$-c_0 \cos \xi - c_1 9 \cos 3 \xi + c_0 a \cos \xi + c_1 a \cos 3 \xi - c_0 q (\cos \xi + \cos 3 \xi) - c_1 q (\cos \xi + \cos 5 \xi) = 0 \quad (\text{A.25})$$

agrupando os coeficientes c_0 e c_1 temos:

$$c_0(-\cos \xi + a \cos \xi - q \cos \xi - q \cos 3 \xi) + c_1(-9 \cos 3 \xi + a \cos 3 \xi - q \cos \xi - q \cos 5 \xi) = 0 \quad (\text{A.26})$$

desprezando os termos em coseno de ordens superiores temos:

$$c_0 \cos \xi (a - 1 - q) + c_1 \cos \xi (-q) = 0 \quad (\text{A.27})$$

$$(a - 1 - q)c_0 - qc_1 = 0 \quad (\text{A.28})$$

que se constitui na primeira relação de recorrência.

Em seguida calculamos a relação de recorrência para $n = 2$ onde:

$$c_2(\xi) = c_0 \cos \xi + c_1 \cos 3 \xi + c_2 \cos 5 \xi \quad (\text{A.29})$$

$$c''_2(\xi) = -(c_0 \cos \xi + c_1 9 \cos 3\xi + c_2 25 \cos 5\xi) \quad (\text{A.30})$$

substituindo (A.29) e (A.30) na equação de Mathieu (A.7) temos:

$$-c_0 \cos \xi - c_1 9 \cos 3\xi - c_2 25 \cos 5\xi + (a - 2q \cos 2\xi)(c_0 \cos \xi + c_1 \cos 3\xi + c_2 \cos 5\xi) = 0 \quad (\text{A.31})$$

$$-c_0 \cos \xi - c_1 9 \cos 3\xi - c_2 25 \cos 5\xi + a c_0 \cos \xi + a c_1 \cos 3\xi + a c_2 \cos 5\xi - 2q \cos 2\xi c_0 \cos \xi - 2q \cos 2\xi c_1 \cos 3\xi - 2q \cos 2\xi c_2 \cos 5\xi = 0 \quad (\text{A.32})$$

fazendo as substituições trigonométricas,

$$2 \cos 3\xi \cos 2\xi = \cos \xi + \cos 5\xi \quad (\text{A.33})$$

$$2 \cos 2\xi \cos \xi = \cos \xi + \cos 3\xi \quad (\text{A.34})$$

$$2 \cos 2\xi \cos 5\xi = \cos 3\xi + \cos 7\xi \quad (\text{A.35})$$

e agrupando os termos de mesmo coeficiente temos:

$$c_0 \cos \xi (1 - a - q) - q c_1 \cos 3\xi + c_1 \cos 3\xi (-9 + a) - q c_1 \cos \xi - q c_1 \cos 5\xi + c_2 \cos 5\xi (-25 + a) - q c_2 \cos 3\xi - q c_2 \cos 7\xi = 0 \quad (\text{A.36})$$

da primeira relação de recorrência (eq. A.28) temos que $(a - 1 - q)c_0 - q c_1 = 0$ e eliminando os termos em coseno de ordens superiores temos:

$$-q c_0 \cos 3\xi + c_1 \cos 3\xi (a - 9) - q c_2 (\cos 3\xi) = 0 \quad (\text{A.37})$$

$$\cos 3\xi [-q c_0 + c_1 (a - 9) - c_2 q] = 0 \quad (\text{A.38})$$

portanto o termo entre colchetes deve ser nulo,

$$-q c_0 + c_1 (a - 9) - c_2 q = 0 \quad (\text{A.39})$$

re-arranjando os termos temos:

$$-q c_0 + (a - 9) c_1 - q c_2 = 0 \quad (\text{A.40})$$

a relação acima se constitui na segunda relação de recorrência.

Generalizando temos:

$$\{ (2n + 1)^2 - a \} c_n + q(c_{n+1} + c_{n-1}) = 0 \quad (\text{A.41})$$

onde $n = 1, 2, 3, \dots$

ou seja

$$\{ a - (2n + 1)^2 \} c_n - q(c_{n+1} + c_{n-1}) = 0 \quad (\text{A.42})$$

As eqs. (A.28) e (A.42) devem ser consistentes e a condição de sua consistência é:

$$\Delta(a, q) = \begin{bmatrix} a - 1 - q & -q & 0 & 0 & \dots \\ -q & a - 9 & -q & 0 & \dots \\ 0 & -q & a - 25 & -q & \dots \\ 0 & 0 & -q & a - 49 & \dots \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \dots \end{bmatrix} = 0 \quad (\text{A.43})$$

Portanto para que possam existir soluções periódicas, as constantes a e q devem ter um dos valores determinados pela equação determinantal:

$$\Delta(a, q) = 0 \quad (\text{A.44})$$

Os valores de a e q são conhecidos como valores característicos; se a e q forem conhecidos, os coeficientes c_n podem ser obtidos pelas relações de recorrência e são determinados unicamente, a não ser por um fator constante. Em geral as relações de recorrência são normalizadas [55] com a condição $c_0 = 1$. Assumindo esta condição e fazendo uso das relações de recorrência (A.28) e (A.42), podemos calcular explicitamente

os coeficientes c_n o que nos leva à solução da equação de Mathieu para o caso considerado, ou seja:

$$u(\xi) = \sum_0^{+\infty} c_n \cos(2n+1)\xi =$$

$$c_0 \cos \xi + c_1 \cos 3\xi + c_2 \cos 5\xi + c_3 \cos 7\xi + \dots = \quad (\text{A.46})$$

$$\cos \xi + \frac{(a-1-q)}{q} \cos 3\xi + \frac{(a-9)(a-1-q)}{q^2} \cos 5\xi + \frac{(q+1-a)}{q^3} \{(25-a)(a-9)+1\} \cos 7\xi + \dots \quad (\text{A.47})$$

A expressão acima nos dá a posição de um íon dentro de um campo quadrupolar a cada instante, considerando as condições referidas anteriormente para $\beta=1$.

Como vimos anteriormente, as constantes a e q no caso específico da armadilha iônica, são determinadas por parâmetros físicos conhecidos como observamos abaixo onde u representa um dos eixos coordenados:

$$a_u = \frac{8eU}{mr_0^2 \Omega^2} \quad e \quad q_u = \frac{4eV}{mr_0^2 \Omega^2} \quad (\text{A.48})$$

Observe que a condição $\beta = 1$, ou seja, um valor inteiro de β , nos leva, segundo Dawson [77] ao caso das soluções que nada mais são do que as fronteiras entre as regiões instáveis e estáveis do diagrama de estabilidade e são referidas como curvas características ou valores característicos, ou seja:

$$\mu = i\beta \quad \text{onde } \beta \text{ é um número inteiro.}$$

No caso em que $\mu = i\beta$ onde β é um número não inteiro, teremos soluções periódicas e estáveis para a equação de Mathieu.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] RAY, D. E. *Pesticides Derived from Plants and Other Organisms. Handbook of Pesticide Toxicology*, volume 2, Class of Pesticides. United Kingdom: Academic, 1991.
- [2] WARE, G. W. *Fundamentals of Pesticides*. USA: Thomson Publications, p.79-84; 1st ed, 1982.
- [3] World Health Organization. *Environmental Health Criteria 97-Deltamethrin*. Geneva: WHO, 1990.
- [4] FERNANDES, F. F. Atividade *in vitro* de permetrina, cipermetrina e deltametrina sobre larvas *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). *Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec*, v. 56, n. 6, p. 1-9, 2000.
- [5] CURTIS, C. F.; MNZAVA, E. P. Comparison of house spraying and insecticide-treated nets for malaria control. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 78, n. 12, p. 1389-1400, 2000.
- [6] DIOTAIUTI, L.; MARQUES PENIDO, C.; SARAIVA DE ARAÚJO, H.; SCHOFIELD, C. J.; TEIXEIRA PINTO, C. Efeito excito-repelente da deltametrina sobre triatoneos em condições de laboratório. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, n. 3, p. 247-252, 2000.
- [7] ALZOGARAY, R.A.; ZERBA, E. N. Incoordination, paralysis and recovery after pyrethroid treatment on Nymphs III of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 92, n. 3, p. 431-435, 1997.
- [8] BÜCHEL, K. H. *Chemistry of Pesticides*. New York, NY: John Wiley, 1983.
- [9] SHERMA, J. General – Pesticides. *Analytical Chemistry*, v. 67, n. 12, p. 1R – 20R, 1995.
- [10] GUYTON, A. C. *Tratado de Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara, 1986.
- [11] BELL, G.H.; DAVIDSON, J. N.; SCARBOROUGH, H. *Textbook of Physiology and Biochemistry*. Edingburgh, UK: Livingstone, 1963.
- [12] WARE, G. W. *An Introduction to Insecticides*. Tucson, AR: University of Arisona, 1999.
Disponível em: <<http://ipmworld.umn.Edu/chapters/ware.htm>> acesso em: 20/02/2001.
- [13] YAMAMOTO, I. *Biochemical Toxicology of Insecticides – Problems in Mode of action of Pyrethroids*. London, UK: Academic, 1970.

- [14] OGA, S. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo, SP: Atheneu, 1980.
- [15] GO, V.; GAREY, J.; WOLFF, M. S.; POGO, B. G. T. Estrogenic Potential of Certain Pyrethroid Compounds in the MCF-t Human Breast Carcinoma Cell Line. *Environmental Health Perspectives*, v. 107, p. 173-177, 1999.
- [16] CONDES-LARA, M.; GRAFF-GUERRERO, A.; VEGA-RIVEROLL L. Effects of cypermethrin on the electroencephalographic activity of the rat: A model of chemically induced seizures. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 21, n. 3, p. 293-298, 1999.
- [17] BARRIDGE, L. E.; HAYA, K.; PAGE, F. H.; WADDY, S. L.; ZITKO, V.; WADE, J. The Lethality of the Cypermethrin Formulation Excis® to Larval and Post-Larval Stages of the American Lobster (*Homarus americanus*). *Aquaculture*, v. 181, p. 37-47, 2000.
- [18] SINGH, A.; SRIVASTAVA, V. K. Toxic Effect of Synthetic Pyrethroid Permethrin on the Enzyme System of the Freshwater Fish *Channa striatus*. *Chemosphere*, v. 39, n. 11, p. 1951-1956, 1999.
- [19] VAIS, H.; ATKINSON, N.; ELDURSI, N.; DEVONSHIRE, A. L.; WILLIAMSON, M. S. A Single Amino Acid Change Makes a Rat Neuronal Sodium Channel Highly Sensitive to Pyrethroid Insecticides. *FEBS Letters*, v. 470, p. 135-138, 2000.
- [20] YOONSEONG, P.; TAYLOR, M. F. J. A Novel Mutation L1029H in Sodium Channel Gene *hscp* Associated with Pyrethroid Resistance for *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 27, n. 1, p. 9-13, 1997.
- [21] LEE, S.H.; SMITH, T. J.; KNIPPLE, D. C.; SODERLUND, D. M. Mutations in the house fly *Vssc1* Sodium Channel Gene Associated with *super-kdr* Resistance Abolish the Pyrethroid Sensitivity of *Vssc 1/tipE* Sodium Channels Expressed in *Xenopus* Oocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 29, p. 185-194, 1998.
- [22] LIU, Z.; VALLES, S. M.; DONG, K. Novel Point Mutations in the German Cockroach *para* Sodium Channel Gene are Associated with Knockdown Resistance (*kdr*) to Pyrethroid Insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 30, p. 991-997, 2000.
- [23] World Health Organization. *Health Criteria and other Supporting Information-Vol. 2*. Geneva, Switzerland, 1996.
- [24] ZHANG, L.-Z.; KHAN, S. U.; AKHTAR, M. H.; IVARSON, K. C. Persistence, Degradation, and Distribution of Deltamethrin in a Organic Soil under Laboratory Conditions. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, v. 32, n. 6, p.1207-1211, 1984.
- [25] MAGUIRE, R. J.; CAREY, J. H.; HART, J. H.; TKACZ, R. J.; LEE, H.-B. Persistence and Fate of Deltamethrin Sprayed on a Pond. *J. of Agriculture and Food Chemistry*, v. 37, n. 4, p. 1153-1159, 1989.

- [26] BISSACOT, D.Z.; VASSILIEFF, I. Pyrethroid Residues in Milk and Blood of Dairy Cows Following Single Topical Applications. *Veterinary and Human Toxicology*, v. 39, n. 1, p. 6-8, 1997.
- [27] BISSACOT, D. Z.; VASSILLIEFF, I. HPLC Determination of Flumethrin, Deltamethrin, Cypermethrin, and Cyhalothrin Residues in the Milk and Blood of Lactating Dairy Cows. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 21, p. 397-402, 1997.
- [28] HOFF, R. G. van der; PELUSIO, F.; BRINKMAN, U. A. Th.; BAUMANN, R. A.; ZOONEN, P. van. Automated Solid-Phase Extraction Coupled to Gas Chromatography with Electron-Capture Detection: a Combination of Extraction and Clean-up of Pyrethroids in the Analysis of Surface Water. *Journal of Chromatography A*, v. 719, p. 59-67, 1996.
- [29] DI MUCCIO, A.; PELOSI, P.; BARBINI, D. A.; GENERALI, T.; AUSILI, A.; VERGORI, F. Selective Extraction of Pyrethroids Pesticide Residues from Milk by Solid-Matrix Dispersion. *Journal of Chromatography A*, v. 765, p. 51-60, 1997.
- [30] COLUMÉ, A.; CÁRDENAS, S.; GALLEGRO, M.; VALCÁRCEL, M. Semiautomatic Multiresidue Gas Chromatographic Method for Screening of Vegetables for 25 Organochlorine and Pyrethroid Pesticides. *Analytica Chimica Acta*, v. 436, p. 153-162, 2001.
- [31] GELSOMINO, A.; PETROVICOVÁ, B.; TIBURTINI, S.; MAGNANI, E.; FELICI, M. Multiresidue Analysis of Pesticides in Fruits and Vegetables by Gel Permeation Chromatography Followed by Gas Chromatography with Electron-Capture and Mass Spectrometric Detection. *Journal of Chromatography A*, v. 782, p. 105-122, 1997.
- [32] DI MUCCIO, A.; BARBINI, D. A.; GENERALI, T.; PELOSI, P.; AUSILI, A.; VERGORI, F.; CAMONI, I. Clean-up of Aqueous Acetone Vegetable Extracts by Solid-Matrix Partition for Pyrethroid Residue Determination by Gas Chromatography-Electron-Capture Detection. *Journal of Chromatography A*, v. 765, n. 1, p. 39-49, 1997.
- [33] LIU, J.; SUZUKI, O. Conditions of solid-phase extraction for the mixture of Organophosphates and Synthetic Pyrethroids in Human Body Fluids. *Forensic Science International*, v. 99, p. 159-161, 1999.
- [34] DAVIDYUK, E. I.; DEMCHENKO, V. F.; KLISENKO, M. A. Rapid Group Separation and Identification of Chlorinated Organic Compounds by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 52, n. 11, p. 1058-1065, 1997.
- [35] GALERA, M. M.; MARTÍNEZ-VIDAL, J. L.; GARRIDO FRENICH, A.; GIL GARCÍA, M. D. Determination of Cypermethrin, Fenvalerate and *cis*- and *trans*-Permethrin in Soil and Groundwater by High-Performance Liquid Chromatography Using Partial Least-Squares Regression. *Journal of Chromatography A*, v. 727, p. 39-46, 1996.
- [36] MAO, J.; ERSTFELD, K. M.; FACKLER, P. H. Simultaneous Determination of Tralomethrin, Deltamethrin, and Related Compounds by HPLC with Radiometric Detection. *Journal of Agric. Food Chemistry*, v. 41, p. 596-601, 1993.

- [37] PATSIAS, J.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Rapid Method for the Analysis of a Variety of Chemical Classes of Pesticides in Surface and Ground Waters by Off-Line Solid Phase Extraction and Gas Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 740, p. 83-98, 1996.
- [38] BAUERLE, G. F. Jr.; RAY, K. L.; Brodbelt, J. S. Determination of Pyrethroid Insecticides by Ion-Trap GC-MS-MS. *Analytica Chimica Acta*, v. 317, n. 1-3, p. 137-148, 1995.
- [39] PANG, G. F.; CAN, Y. Z.; FAN, C. L.; ZHANG, J. J.; LI, X. M.; MU, J.; WANG, D. N.; LIU, S. M.; SONG, W. B.; LI H. P.; WONG, S. S.; KUBINEC, J. T.; TAHOTNA, S. Interlaboratory Study of Identification and Quantitation of Multiresidue Pyrethroids in Agricultural Products by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography -A*, v. 882, p. 231-238, 2000.
- [40] CLASS, T. J. Environmental Analysis of Cypermethrin and its Degradation Products after Forestry Applications. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 49, n. 4, p. 189-205, 1992.
- [41] OKIHASHI, M.; OBANA, H.; HORI, S.; NISHIMUNE, T. Development of Simultaneous Analysis for Organonitrogen and Pyrethroid Pesticides with GC/MS. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, v. 35, n. 3, p. 258-261, 1994.
- [42] MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J.; HAJŠLOVA, J. Optimization and evaluation of low-pressure gas chromatography-mass spectrometry for the fast analysis of multiple pesticides residues in a food commodity. *Journal of Chromatography -A*, v. 926, p. 291-308, 2001.
- [43] OIDE, E. E.; VEGA-BUSTILLOS, J. O.; MUNITA, C. J. A. S. Utilização da Técnica da Ionização Química para a Análise do Deltametrin por GC/MS. *4th Meeting on Nuclear Applications*, p. 90, 1997.
- [44] CLASS, T. J.; BACHER, R.; BOEHNER, W.; BERGMANN, M. Determination of Pyrethroids in Indoor Dust by GC/MS. *GIT Fachz. Lab.*, v. 39, n. 4, p. 305-306, 1995.
- [45] ARREBOLA, F. J.; MARTÍNEZ-VIDAL, J. L.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; AKHTAR, M. H. Monitoring of Pyrethroids Metabolites in Human Urine Using Solid-Phase Extraction Followed by Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 401, n. 1-2, p. 45-54, 1999.
- [46] SASSINE, A.; MOURA, S. C.; VEGA-BUSTILLOS, J. O. Estudo Comparativo entre as Técnicas de Ionização por Impacto de Elétrons e Ionização Química na Análise do Inseticida Permetrina via GC/MS-IT. *Anais Assoc. Brás. Quím.*, v. 49, n. 4, p. 208-213, 2000.
- [47] SCHACHERLE, S.; BRITTAN, R. D.; MILLS, J. D. Analysis of Pesticide Residues in Food Using Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with a Benchtop Ion-Trap Mass Spectrometer. *Journal of Chromatography A*, v. 683, p. 185-193, 1994.

- [48] YASIN, M.; BAUGH, P. J.; BONWICK, G. A.; DAVIES, D. H.; HANCOCK, P.; LEINOUDI, M. Analytical Method Development for the Determination of Synthetic Pyrethroid Insecticides in Soil by Gas Chromatography-Mass Spectrometry Operated in Negative-Ion Chemical-Ionization Mode. *Journal of Chromatography*, v. 754, p. 235-243, 1996.
- [49] BAUGH, P. J. *Gas Chromatography, A Practical Approach*. Oxford, UK: Oxford University, 1993.
- [50] COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. *Introdução a Métodos Cromatográficos*. Campinas, SP: UNICAMP, 1987.
- [51] MARCH, R.E.; TODD, J.F.J. *Practical Aspects of Ion Trap Mass Spectrometry*. Vols. 1,2 and 3, Modern Mass Spectrometry Ion Trap series, Boca Raton, FL: CRC, 1995.
- [52] PAUL, W., STEINWEDEL, H. *Apparatus for separating charged particles of different specific charges*. German Patent 944, 900, 1056; U.S. Patent 2,939,952, 7 June 1960.
- [53] COOKS, R.G.; GLISH, G.L.; McLUCKEY, S.A.; KAYSER, R.E. *Ion Trap Mass Spectrometry*. Chemical & Engineering News, v. 69, p. 26, 1991.
- [54] MATHIEU, É. Mémoire sur le mouvement vibratoire d'une membrane de forme elliptique. *J. Math. Purès Appl.* V13: 137. 1868.
- [55] SPLENDORE, M.; LAUSEVIC, Z.; MARCH, R.E. Resonant Excitation and/or Ejection of Ions Subjected to DC and RF fields in a Commercial Quadrupole Ion Trap. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 11, p. 228-233, 1997.
- [56] MARCH, R.E. A Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 32, p. 351-369, 1997.
- [57] DAS, K. G. *Pesticides Analysis*. New York, NY: Marcel Dekker, 1981.
- [58] HARRISON, A. G. *Chemical Ionization Mass Spectrometry*. Boca Raton, FL: CRC, 1992.
- [59] FISHER, E. Three-dimensional stabilization of charge carriers in a quadrupole field. *Z. Phys.*, v. 156, n. 1, p. 1-26, 1959.
- [60] DEHMELT, H. G. Radiofrequency spectroscopy of stored ions. I. Storage. *Adv. At Mol. Phys.*, v. 3, p. 53-72, 1967.
- [61] LIAS, S. G.; LIEBMAN, J. F.; LEVIN, R. D. Evaluated Gas Phase Basicities and Proton Affinities of Molecules; Heat of Formation of Protonated Molecules. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, v. 13, n. 3, p. 695-806, 1984.
- [62] McNAIR, H. M. *Cromatografía a Gases*. Washington, DC.: Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, 1981.

[63] STEINWANDTER, H. An On-Line Method for Extracting and Isolating Chlorinated Hydrocarbon Pesticides and Polychlorinated Biphenyls (PCB's) from Milk and Dairy Products. *Fresenius Zeitschrift Anal. Chem*, v. 312, p. 342-5, 1982.

[64] BARRETTO, H.H.C.; INOMATA, O. N. K.; LEMES, V.R.R. Estudo Comparativo de Métodos para Determinação de Pesticidas Organoclorados. *Ver. Inst. Adolf Lutz*, v. 51, n. 1 e 2, p. 69-74, 1991.

[65] SNYDER, R. L. Classification of the Solvent Properties of Common Liquids. *Journal of Chromatography*, v. 92, p. 223-230, 1974.

[66] SNYDER, R. L. Classification of the Solvent Properties of Common Liquids. *Journal of Chromatography Science*, v. 16, p. 223-234, 1978.

[67] LENG, G.; KUHN, K. H.; IDEL, H. Biological Monitoring of Pyrethroids in Blood and Pyrethroids Metabolites in Urine; Applications and Limitations. *The Science of Total Environment*, v. 199, p. 173-181, 1997.

[68] NARAHASHI, T. *Neurotoxicology of insecticides and pheromones*. New York, NY: Plenum, 1978.

[69] SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T.A. *Principles of Instrumental Analysis*. Orlando, FL: Saunders College, 1992.

[70] VOGEL, A. *Análise Inorgânica Quantitativa*. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Dois, p.6-7, 1981.

[71] JENSEN, R. G. Comments on the Extraction of Fat from Human Milk for Analysis of Contaminants. *Chemosphere*, v. 31, n. 39, p. 4197-4205, 1995.

[72] World Health Organization. *Environmental Health Criteria 82-Cypermethrin*. Geneva, Switzerland, 1989.

[73] MARONI, M.; COLOSIO, C.; FERIOLI, A.; FAIT, A. Introduction. *Toxicology*, v. 143, p. 5-118, 2000.

[74] INCE, E. L. *Ordinary Differential Equations*. New York, NY: Dover publication, 1944.

[75] JAEGER, J. C. *An Introduction to Applied Mathematics*. Oxford, UK: Oxford at the Clarendon, 1951.

[76] BONNER, R.F. *A study of the quadrupole ion storage source*. Ph. D. Thesis, Univ. of Kent, Canterbury, UK, 1974.

[77] DAWSON, P. H. *Quadrupole Mass Spectrometry and its Applications*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 1976.